

Parakrine Regulation der
VEGF-Rezeptoren-1 und -2 in humanen Endothelzellen:
Einfluß primärer Granulosazellen

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Daniela Wenzel
aus Braunschweig

1. Referent: PD Dr. G. Gross

2. Referent: Prof. Dr. L. Flohé

eingereicht am: 26. März 2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12. Juni 2001

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Neulen, J., Wenzel, D., Wünsch, E., Weissenborn, U., Büttner, R., Weich, H. A.: Poor responder – high responder: the importance of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) in ovarian stimulation protocols. Human Reproduction, 16:621-626 (2001).

Tagungsbeiträge:

Wenzel, D., Griesel, C., Böldicke, T.: Regulation von VEGF-Rezeptoren 1 und 2 in frisch isolierten und kultivierten humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC). (Poster) 2. Symposium der Endothelzell-Biologie, Münster (1999).

Wenzel, D., Hornig, C., Neulen, J., Weich, H. A.: Expression of soluble FLT-1 (sVEGFR-1) in cocultured endothelial and granulosa cells and in follicle fluids. (Poster) Int. Meeting on Angiogenesis, Amsterdam (2000).

Wenzel, D., Hornig, C., Neulen, J., Deutsch, U., Weich, H. A., Greger, K.: Detection and functional analysis of soluble FLT-1 receptor (sVEGFR-1) as a regulator of VEGF bioavailability during organogenesis. (Poster) Int. Symposium of the German Priority Research Program SPP1069 (2000).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Entstehung der Blutgefäße.....	1
1.2	Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	2
1.3	Die VEGF-Rezeptoren.....	4
1.4	Das Corpus luteum und die Granulosazellen als Beispiel einer physiologischen Angiogenese.....	12
1.5	Aufgabenstellung.....	14
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Chemikalien.....	15
2.2	Zellkultur.....	15
2.2.1	Humane primäre Endothelzellen.....	16
2.2.2	Humane Zellen und Zelllinien.....	17
2.2.3	Isolation von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene.....	18
2.2.4	Immunfluoreszenz mit anti-von-Willebrand-Faktor Antikörper zur Spezifizierung von Endothelzellen.....	18
2.2.5	Kryokonservierung von humanen Zellen.....	19
2.2.6	Mitogenassay mit Endothelzellen.....	19
2.2.7	Stimulation mit Zytokinen und Faktoren.....	20
2.2.8	Gewinnung von Granulosazellen aus Follikelpunktaten und Nachweis der Inhibin-Synthese.....	21
2.3	Kokultur humaner Endothelzellen mit Granulosazellen.....	22
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.4.1	RNA-Isolation.....	23
2.4.2	Elektrophoretische Auftrennung der RNA in Formaldehyd-Gelen.....	24
2.4.3	Northern Blotting.....	24

2.4.4	Herstellung der Hybridisierungssonden.....	25
2.4.5	Radioaktive Markierung von cDNA-Sonden.....	26
2.4.6	Northern Hybridisierung.....	26
2.4.7	cDNA-Synthese.....	27
2.4.8	RT-PCR.....	27
2.4.9	Gelelektrophoretische Auftrennung von cDNA-Fragmenten.....	29
2.5	Proteinchemische Methoden.....	29
2.5.1	Bestimmung der sVEGFR-1-Konzentration mittels ELISA.....	29
2.5.2	Iodierung rekombinanter Proteine.....	31
2.5.3	Bindungsexperimente mit radioaktiv-markierten rekombinanten Proteinen.....	31
2.5.4	Immunpräzipitation.....	32
2.5.5	SDS-PAGE.....	32
2.5.6	Western Blotting.....	33
2.5.7	BCA-Test.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Die Kultur humaner Endothelzellen.....	35
3.1.1	Die Primärzellkultur humaner Endothelzellen.....	35
3.1.2	Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Faktoren auf die Mitogenität der Endothelzellen.....	36
3.1.3	Stimulation der primären Endothelzellen mit Zytokinen.....	39
3.2	Expression der VEGF-Rezeptoren in humanen primären Endothelzellen.....	41
3.2.1	Untersuchung der Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 in humanen primären Endothelzellen.....	41
3.2.2	Untersuchung der VEGFR-2-Proteinexpression in primären Endothelzellen.....	44
3.2.3	Untersuchung der sVEGFR-1-Sekretion in primären Endothelzellen.....	45
3.2.4	Bindungsstudien mit VEGF ₁₆₅ und humanen primären Endothelzellen.....	46

3.3	Regulation der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 in humanen Endothelzellen.....	47
3.3.1	Die Regulation der VEGF-Rezeptoren.....	48
3.3.2	Die Expression der <i>flt-1</i> - und <i>KDR</i> -Gene in humanen Endothelzellen.....	51
3.3.3	Die Sekretion von sVEGFR-1 in humanen Endothelzellen.....	53
3.3.4	Die Proteinexpression von VEGFR-2 in humanen Endothelzellen.....	55
3.4	Der Einfluß von Granulosazellen auf Endothelzellen <i>in vitro</i>	56
3.4.1	Die Kultur humaner Granulosazellen.....	56
3.4.2	Kokultivierung humaner Endothelzellen mit humanen Granulosazellen.....	56
3.4.2.1	Die direkte und indirekte Kokultur.....	57
3.4.2.2	Einfluß der Kokultivierung auf die Expression der VEGF-Rezeptoren.....	60
3.4.2.3	Direkte Kokultur der Endothelzellen mit weiteren humanen Zellen.....	62
3.4.3	Einfluß der GC-konditionierten Medien auf primäre Endothelzellen.....	63
3.4.3.1	Einfluß der GC-konditionierten Medien auf die Mitogenität von Endothelzellen.....	64
3.4.3.2	Einfluß der GC-konditionierten Medien auf die Transkription der VEGF- Rezeptoren.....	64
3.4.3.3	Einfluß der GC-konditionierten Medien auf die Expression von sVEGFR-1.....	65
3.4.3.4	Einfluß der GC-konditionierten Medien auf die Proteinexpression von VEGFR-2-Rezeptoren.....	66
3.4.3.5	Einfluß der modifizierten Granulosazell-Kulturüberstände auf Endothelzellen.....	67
3.4.4	Effekte der humanen Granulosazelllinie HO-23 auf primäre Endothelzellen.....	69
3.4.4.1	Die humane Granulosazelllinie HO-23.....	69
3.4.4.2	Einfluß der Kokultivierung mit HO-23-Zellen auf die sVEGFR-1-Sekretion in Endothelzellen.....	69
3.4.4.3	Einfluß der HO-23-konditionierten Medien auf die sVEGFR-1-Expression.....	70
3.5	Untersuchungen von Realproben aus dem Ovar.....	71
3.5.1	Vorkommen der löslichen Form des VEGFR-1 in Follikelflüssigkeiten.....	71
3.5.2	Die sVEGFR-1-Konzentration in Follikelpunktionsflüssigkeiten für die IVF- Oozytengewinnung.....	72

3.5.3	Zusammenhänge der sVEGFR-1-Konzentration in den führenden Follikeln.....	75
3.6	Untersuchungen zur Freisetzung des löslichen VEGFR-1.....	76
3.6.1	Bindungsstudien zur sVEGFR-1-Freisetzung auf HUVE-Zellen.....	77
3.6.2	ELISA-Studien zur sVEGFR-1 Freisetzung auf HUVE-Zellen.....	79
4	Diskussion.....	81
4.1	Die Kultur humaner primärer Endothelzellen.....	81
4.2	Die Regulation der VEGF-Rezeptoren in humanen Endothelzellen.....	85
4.3	Der <i>in vitro</i> Einfluß von humanen Granulosazellen auf Endothelzellen.....	87
4.4	Untersuchungen von Realproben aus dem Ovar.....	90
4.5	Untersuchungen zur Freisetzung des löslichen VEGFR-1.....	92
5	Zusammenfassung.....	96
6	Literatur.....	97

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfid
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CL	Corpus luteum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
FCS	fötales Kälberserum
FF-Mas	Meiosis Activating Factor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCG	humanes Choriongonadotropin
Ig	Immunglobulin
IVF	In Vitro Fertilisation
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
M	Molarität
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pezentia hydrogenii, Stärke des Wasserstoffs
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N' –Tetramethylethylendiamin
UV	Ultraviolettes Licht

1 Einleitung

1.1 Die Entstehung der Blutgefäße

Während der Embryonalentwicklung werden Blutgefäße durch eine *de novo*-Synthese von Endothelzellen aus mesodermalen Vorläufern aufgebaut. Dieser Vorgang wird als Vaskulogenese bezeichnet (Risau, 1997). Dabei werden Blutgefäße aus frühen Vorläuferzellen im Dottersack des Embryos gebildet. Der dabei entstehende primäre Gefäßplexus wird anschließend durch Sprossung und Verzweigung umgeformt.

Der weitere Umbau des primären Gefäßsystems erfolgt durch einen Prozeß der Blutgefäßneubildung aus bereits bestehenden Gefäßen. Diesen Prozeß bezeichnet man als Angiogenese. Nach Anregung durch einen positiven Stimulus beginnen neue Blutkapillaren auszusplassen, in dem die Basalmembran lokal durch Proteolyse abgebaut wird. Es werden in Richtung dieses angiogenen Stimulus solide Stränge aus Endothelzellen geformt, die sich durch Proliferation verlängern und nachträglich ein Lumen zum Bluttransport bilden. Abschließend wird eine Basalmembran um das neue Gefäß gebildet. Zur Reifung des Gefäßes und zur Stabilisierung des ruhenden Endotheliums werden Perizyten und glatte Muskelzellen um die Basalmembran angeordnet (Ausprunk und Folkman, 1977; Hanahan, 1997).

Natürliche angiogene Prozesse im adulten Körper sind auf wenige physiologische Vorgänge wie den der Wundheilung und den zyklischen Aufbau von Endometrium und Corpus luteum beschränkt (ten Dijke und Iwata, 1989; Philips et al., 1990). Zusätzlich sind viele pathophysiologische Situationen wie beispielsweise Retinopathien, rheumatische Arthritis, Psoriasis und Tumorwachstum bekannt (Ferrara und Davis-Smyth, 1997).

Viele unterschiedliche Faktoren beeinflussen die Angiogenese, so daß dieser strikt regulierte Vorgang schnell in einem ruhenden Endothel induziert werden kann, wenn eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen angiogenen und nicht angiogenen Faktoren eintritt (Hanahan und Folkman, 1996).

Als positive Regulatoren wurden Wachstumsfaktoren wie Fibroblast Growth Factor 1 und 2 (FGF-1, saurer FGF; FGF-2, basischer FGF), Transforming Growth Factor alpha und beta (TGF-alpha; TGF-beta), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) und Angiogenin beschrieben (Folkman und Shing, 1992; Risau, 1997). Potentielle negative Faktoren sind Thrombospondin (God et al., 1990;

DiPietro et al., 1997), das N-terminale 16 kDa große Fragment des Prolaktins (Ferrara et al., 1991) sowie Angiostatin (O'Reilly et al., 1994) und Endostatin (O'Reilly et al., 1997) (Abb.1.1).

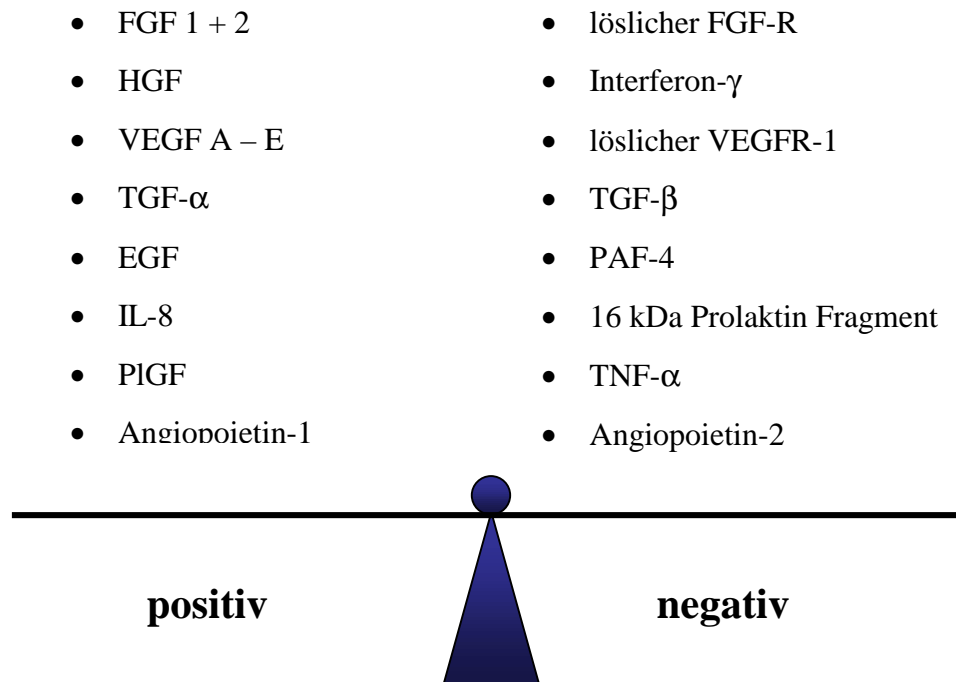


Abb.1.1: Schematische Gegenüberstellung der negativen und positiven Regulatoren der Angiogenese.

1.2 Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Ein Faktor, der nicht nur in physiologischen und pathologischen Situationen eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt, sondern auch schon während der Embryonalentwicklung, ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF oder auch VEGF-A genannt) induziert die Proliferation und steigert die Permeabilität vaskulärer Endothelzellen (Senger et al., 1986). Die mitogene Wirkung vermittelt VEGF nur auf endotheliale Zellen, der saure Fibroblast Growth Factor (aFGF) und basische Fibroblast Growth Factor (bFGF) hingegen wirken auch auf andere Zellen stimulatorisch. Die Rezeptoren, an die VEGF mit hoher Affinität bindet, werden nahezu ausschließlich von Endothelzellen exprimiert (Ferrara et al., 1991).

VEGF-A ist ein Cysteinknoten-Protein. Alle acht vorliegenden Cysteinreste sind stark konserviert und dienen der Disulfidbrückenbindung. Diese Verbindungen stabilisieren die einzelnen Monomere und verbinden diese zu aktiven VEGF Dimeren (Bussolino et al., 1997). Die kodierende Sequenz des VEGF-Gens besteht aus acht Exons. VEGF kann in fünf unterschiedlichen Isoformen vorliegen, die durch alternatives Spleißen der Primärtranskripte desselben Genproduktes entstehen. Aufgrund der resultierenden Aminosäureanzahl des nativen Proteins werden die Spleißvarianten mit VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ bezeichnet (Tischer et al., 1991; Ferrara et al., 1991; Charnock-Jones et al., 1993). Die Spleißvarianten werden unterschiedlich aus verschiedenen Exons aufgebaut, wobei die Exons 1 bis 5 für den N-terminalen sowie Exon 8 für den C-terminalen Bereich immer exprimiert werden. Die entstehenden Proteine haben eine molekulare Masse von 18 bis 24 KDa (Ferrara und Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989; Connolly et al., 1989). Trotz des 26 Aminosäuren langen Signalpeptides findet nur eine effektive Sekretion der kürzeren Proteine statt, die 189 und 206 Aminosäuren langen Derivate liegen an Heparansulfate der Zelloberfläche und die extrazelluläre Matrix gebunden vor. Dieses unterschiedliche Verhalten resultiert aus den alternativ gespleißten Exons 6 und 7, welche die Heparin-Bindung und die Zellssoziation vermitteln (Houck et al, 1992).

In vielen Zelltypen und Geweben konnte die physiologisch vorkommende VEGF-Expression gezeigt werden. Dazu gehören u. a. Makrophagen, glatte Muskelzellen, Osteoblasten, Keratinozyten und Gewebe wie Epidermis, Lunge, Hypophyse und Gehirn während der Embryonalentwicklung (Berse et al., 1992; Ferrara et al., 1991; Harada et al., 1995; Freeman et al., 1995; Brown et al., 1992; Viac et al., 1997; Ferrara und Henzel, 1989). Ebenfalls konnte in vielen Tumorzellen und -geweben eine VEGF-Expression nachgewiesen werden, die eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Metastasierung von Tumorgeweben spielt (Senger et al., 1993).

Der stärkste Regulator der VEGF-A-Expression ist der Sauerstoffmangel in einem Gewebe, die Hypoxie. In Tumorgeweben kommt es aufgrund des schnellen Wachstums der Stromazellen schnell zu einer Sauerstoffunterversorgung, die dann die VEGF-Expression induziert (Shweiki et al., 1992).

VEGF-A ist die am besten charakterisierte Form der VEGF-Familie. Die aufgrund ihrer Homologie ebenfalls als Mitglieder der VEGF-Familie eingestuft Proteine sind VEGF-B bis VEGF-E (Olofsson et al., 1996a; Orlandini et al., 1996; Joukov et al., 1996) und

Placenta Growth Factor (PlGF). Für VEGF-B wurde gezeigt, daß es Heterodimere mit VEGF₁₆₅ ausbilden kann (Olofsson et al., 1996b). VEGF-C und VEGF-D bilden eine neue Untergruppe der VEGF-Familie, da diese beiden Proteine zwar strukturelle Merkmale wie VEGF-A, darüber hinaus aber auch neue Eigenschaften aufweisen, die VEGF-A nicht besitzt. Beide Proteine werden erst im Laufe einer proteolytischen Umwandlung aktiv und beeinflussen die Bildung des lymphatischen Endothels (Achen et al., 1998, Yamada et al., 1997, Joukov et al., 1997). VEGF-E wurde als homologe Sequenz im Genom des Orf Virus entdeckt, dessen entsprechendes Protein VEGFR-2 aktivieren und *in vivo* Angiogenese im Kaninchen-Cornea-Test induzieren kann (Lyttle et al., 1994, Meyer et al., 1999).

Der Placenta Growth Factor (PlGF) wird als dimeres Glykoprotein exprimiert und die Aminosäure-Homologie zu VEGF beträgt bis zu 53 %. (Cao et al., 1997).

1.3 Die VEGF-Rezeptoren

Ebenso wie das angiogene VEGF ist der zugehörige Rezeptor, der das Signal in die Zielzelle vermittelt, die zweite wichtige Komponente des Signalsystems. In vielen Prozessen vermitteln die Rezeptoren vom Rezeptor Tyrosin-Kinase-Typ Signale zum Zellwachstum, zur Differenzierung und zur Morphogenese.

Auch die verschiedenen Mitglieder der VEGF-Familie binden hochaffin an spezifische Tyrosine-Kinase-Rezeptoren, die vor allem auf der Oberfläche vaskulärer Endothelzellen vorkommen. Die miteinander verwandten Rezeptoren besitzen einen aus sieben Immunoglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen bestehenden extrazellulären Bereich (ECD), eine transmembrane Region und eine katalytische Region, die durch ein Kinase-Insert geteilt ist. Das Molekulargewicht beträgt etwa 220 kDa (Shibuya et al., 1999). Die Rezeptoren werden VEGF Rezeptor-1 (VEGFR-1; Flt-1) (Shibuya et al., 1991), VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2; KDR) (Terman et al., 1991) und VEGF Rezeptor-3 (VEGFR-3; Flt-4) (Pajusola et al., 1992) genannt (Claesson-Welsh et al., 1999). Weiterhin besitzen Neuropiline (Neuropilin-1, NP-1; Neuropilin-2, NP-2) aus der Familie Semaphorine/Collapsin-Rezeptoren eine VEGF-bindende Funktion (Soker et al., 1998), die sie als sogenannte Co-Rezeptoren der Tyrosin-Kinasen einordnet. Ihr Vorkommen ist nicht auf Endothelzellen beschränkt (Soker et al., 1998). Im Gegensatz zu den VEGF Rezeptoren-1 und -2 binden sie nicht alle VEGF-Isoformen, sondern nur VEGF₁₆₅ und nicht

VEGF₁₂₁. Ausschlaggebend für diese Bindung ist die Heparin-Bindestelle in den VEGF-Isoformen (Gitay-Goren et al., 1996).

Die drei Rezeptoren zeigen unterschiedliche Verhaltensweisen zu den Liganden. VEGFR-1 bindet alle Isoformen von VEGF-A, PlGF und VEGF-B (Ferrara, 1996a; Sawano et al., 1996; Olofsson et al., 1998). Die Bindungskonstante K_d ist bei VEGF-A zu VEGFR-1 10 pM und bei PlGF bei etwa 100 bis 200 pM (Park et al., 1994). VEGFR-2 bindet neben VEGF auch bestimmte Formen von VEGF-C und VEGF-D (Achen et al., 1998) und VEGF-E (Meyer et al., 1999) wobei die Bindungskonstante eine niedrigere Affinität (K_d 75 bis 125 pM) als VEGFR-1 zu VEGF zeigt (Ferrara, 1996a). VEGF-C und VEGF-D binden ebenfalls mit höherer Affinität an VEGFR-3 (Achen et al., 1998). VEGF-B bis VEGF-E und PlGF sind Liganden der VEGF-Rezeptor-Familie, die allerdings mit höherer Affinität nur an jeweils einen oder zwei der insgesamt drei VEGF-Rezeptoren binden (Abb. 1.2).

Der VEGFR-1 wurde von Shibuya und Mitarbeitern (1991) aus einer humanen Plazenta cDNA Bank kloniert und identifiziert. Das VEGF-bindende Protein wurde mit Flt-1 (fms-like tyrosine kinase) bezeichnet, um damit die hohe Sequenzhomologie zu den Rezeptoren der fms-Gruppe (z. B.: PDGF-R alpha/beta, CSF-1R, c-kit) zu betonen (Ullrich und Schlessinger, 1990). Ein weiterer VEGF-Rezeptor, VEGFR-2, wurde mit hoher Aminosäuresequenzhomologie zu VEGFR-1 aus einer humanen Endothelzellen cDNA-Bank von Terman und Mitarbeitern (1991) isoliert und KDR (kinase insert domain-containing receptor) betitelt. Die Ligandenbindung bewirkt eine Autophosphorylierung. Ein weiterer Rezeptor wurde ebenfalls aus einer humanen Plazenta cDNA Bank isoliert. Die Aminosäuresequenz zeigt nur eine geringe Homologie zu VEGFR-1 und -2 in der intrazellulären Region, allerdings eine mehr als 30 %-ige Homologie im extrazellulären Bereich. Daher wurde das Gen als FLT-4 (fms-like tyrosine kinase 4) bezeichnet (Pajusola et al., 1992).

Aus dem konditionierten Medium von humanen Nabelschnurendothelzellen wurde eine lösliche Form des VEGFR-1 (sVEGFR-1 oder sflt-1) isoliert, die ebenfalls eine hohe Affinität zu VEGF (etwa 10 pM) aufweist und die aus dem extrazellulären Teil des VEGFR-1 besteht (Kendall und Thomas, 1996). Das 110 kDa große Protein besteht nur aus den sechs ersten Ig-ähnlichen Domänen und trägt an seinem C-terminalen

Ende 31 Aminosäuren, die aus einer Intronsequenz stammen. Diese lösliche Rezeptorform wird vermutlich durch alternatives Spleißen der *flt-1*-mRNA gebildet (Abb.1.2).

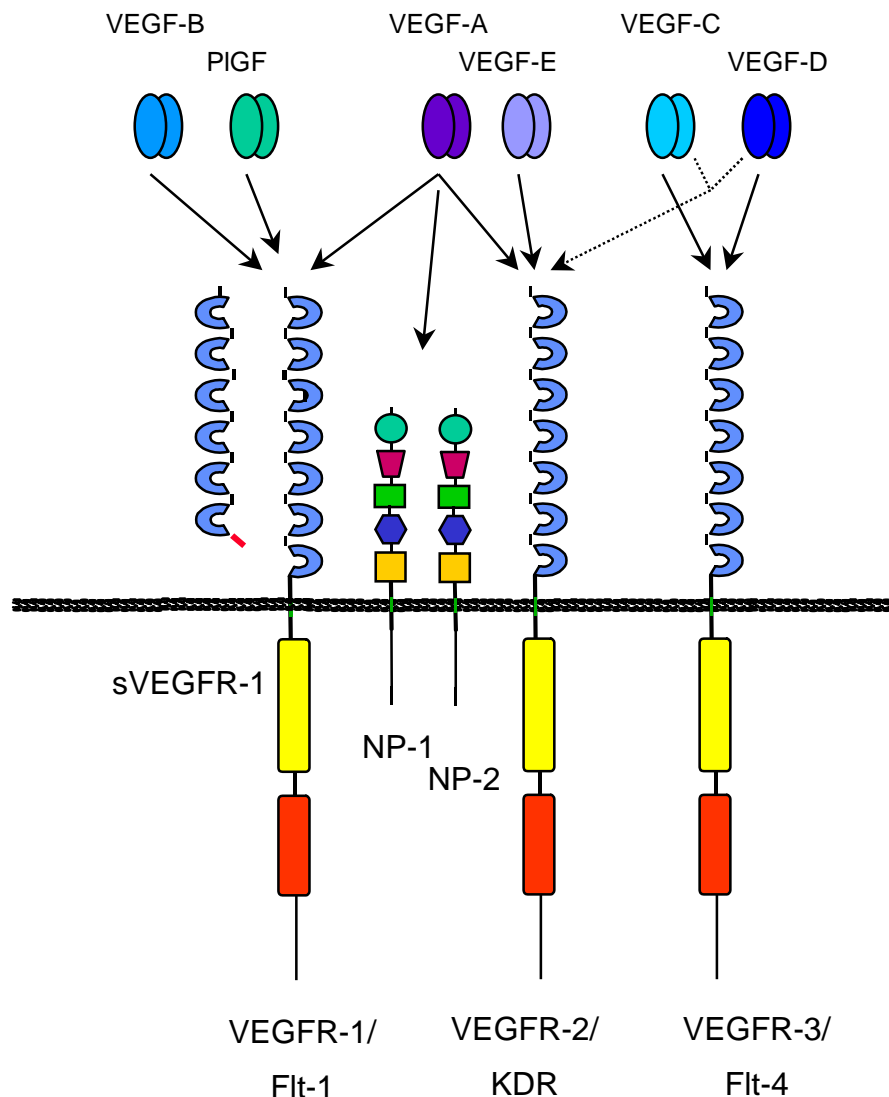


Abb.1.2: Übersicht der VEGF-Rezeptoren, ihrer Liganden und der Neuropiline. Die gleiche Struktur der 3 VEGF-Rezeptoren ist als Schema dargestellt: Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne (blau), einem transmembranen Bereich und der Kinase Region (gelb und rot). Links daneben befindet sich die aus nur 6 Ig-ähnlichen Domänen aufgebaute lösliche Variante des VEGFR-1 (sVEGFR-1) mit dem ihr eigenen C-Terminus (hellrot). Ebenfalls schematisch dargestellt sind die Neuropiline-1 und -2. Die Liganden weisen mit Pfeilen auf die Rezeptoren, an die sie binden können.

Mit Hilfe von chimären Komplexen aus VEGFR-1 und VEGFR-2 konnte die Arbeitsgruppe um Davis-Smyth (1996) zeigen, daß die zweite Ig-ähnliche Domäne im extrazellulären Bereich des VEGFR-1 die spezifische Ligandenerkennung ermöglicht. Weitere Versuche mit rekombinanten Rezeptormolekülen mit den Ig-ähnlichen Domänen

1 bis 3 zeigen eine VEGF Bindung, deren Affinität stark bei Entfernung der dritten Domäne zurückgeht. Die dritte Domäne vermittelt die Bindung zu dem Rezeptor, wobei die umgebenden Domänen zur Stabilisierung des Rezeptor/Liganden-Komplexes beitragen. Die vierte Domäne vermittelt die Dimerisierung der Rezeptoren, die für eine Aktivierung notwendig ist (Barleon et al., 1997a; Tanaka et al., 1997).

In bovinen Aorta-Endothelzellen konnte gezeigt werden, daß VEGF die Phosphorylierung von mindestens 11 Proteinen induziert (Guo et al., 1995). Beispielsweise findet eine Phosphorylierung der Phospholipase C (PLC)- γ , Proteinkinase C (PKC), Phosphatidyl-Inositol-Kinase 3 (PI3) und Mitglieder der Ras Signalkette statt (Ferrara, 1996a; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Shibuya et al., 1999). Diese Phosphorylierungen sind Schritte der Signalkaskade, die nach Dimerisierung der Rezeptormoleküle aktiviert wird. Die Phosphorylierungsstellen in VEGFR-1 sind die Tyrosine 1169, 1213 (Sawano et al., 1997) 1213, 1242, 1327 und 1333 (Ito et al., 1998) und in VEGFR-2 die Positionen 951, 996, 1054 und 1059 (Dougher-Vermazen et al., 1994). Dabei erfolgt eine vermehrte Phosphorylierung von Proteinen mit SH2 (src Homologie 2)-Domänen wie beispielsweise *ras* GTPase aktivierendes Protein, die multimere Aggregate mit den VEGF-Rezeptoren ausbilden (Guo et al., 1995). Dies ist für VEGFR-1 und -2 gültig, doch konnte gezeigt werden, daß beide Rezeptoren unterschiedliche Effekte „induzieren“: Schweineaorta-Endothelzellen, die keine endogenen VEGF-Rezeptoren tragen, zeigen nach Transfektion mit Plasmiden mit der für VEGFR-2 kodierenden Sequenz mitogene und chemotaktische Reaktionen (Waltenberger et al., 1994). Diese Effekte wurden allerdings nicht auf mit VEGFR-1 transfizierten Zellen beobachtet (Waltenberger et al., 1994; Seetharam et al., 1995). Dabei kann in VEGFR-2 exprimierenden Zellen eine starke Liganden-abhängige Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden, die in VEGFR-1 transfizierten Zellen nur schwach oder gar nicht detektierbar ist (Waltenberger et al., 1994; Seetharam et al., 1995). VEGFR-1 exprimierende NIH 3T3 Zellen zeigen ebenfalls nur eine schwache Tyrosinphosphorylierung nach VEGF Stimulation, die keine mitogenen Reaktionen hervorruft (Seetharam et al., 1995).

Transgene Mäuse, die eine Deletion des *flt-1*-Gens tragen, entwickeln einen letalen Phänotyp an Tag 8,5 bis 9,5 der Embryonalentwicklung. Es findet zwar eine Ausbildung von reifen Endothelzellen statt, diese zeigen aber keine geordnete Formation im vorhandenen kardiovaskulären System, sondern akkumulieren im Gefäßlumen (Fong et

al., 1995). In weiteren Versuchen mit transgenen Tieren wurde die Funktion der extrazellulären Domäne des VEGFR-1 untersucht: Eine Deletion der kodierenden Sequenzen für die ECD führte zu Letalität der Embryonen, während eine Deletion der Kinase-region augenscheinlich keine Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen aufwies (Hiratsuka et al., 1998). Transgene Tiere, die durch homologe Rekombination keinen VEGFR-2 exprimieren, überleben ebenfalls nicht den embryonalen Tag 8,5 bis 9,5. Diese Embryonen zeichnen sich durch Abwesenheit differenzierter Endothelzellen und durch bereits frühe Defekte in der Hämatopoese aus (Shalaby et al., 1995).

Eine Inaktivierung des *vegf*-Gens führt bereits bei heterozygoten Mäuseembryonen zur Letalität an Tag 10 bis 11 der Embryonalentwicklung. Die Embryonen sind wachstumsverzögert und zeigen viele Entwicklungsanomalien wie eine unvollständige Blutinselbildung (Brandon et al., 1995).

Die Rezeptoren VEGFR-1 und -2 weisen verschiedene spezifische Funktionen auf, wie es die Phänotypen der VEGF-Rezeptor-deletierten Mäuse zeigen.

Im Mausembryo so wie im Hühnchenembryo konnte eine Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 bei der Anlage früher Blutlakunen und der Bildung von Endothel-Vorläuferzellen beobachtet werden. Damit gelten sie als frühe Marker der Hämatopoese und der Endothelzelldifferenzierung (Millauer et al., 1993; Eichmann et al., 1993). Allerdings zeigten die beiden Rezeptoren ein unterschiedliches Expressionsmuster in der Mausentwicklung, so daß eine einheitliche Regulation der Rezeptorgene unwahrscheinlich ist.

Eine frühe *KDR*-Expression wurde am embryonalen Tag 7 in den Blutinsel-Vorläufern des Dottersacks gezeigt, später auch in den primitiven Endothelzellen, welche die Blutinseln umgeben (Shalaby et al., 1995). Die Expression des *flt-1* konnte an Tag 7 noch nicht in mesodermalen Geweben nachgewiesen werden, sondern erst 1,5 Tage später in den primitiven Endothelzellen außerhalb der Blutinseln und den vaskulären Endothelzellen des Embryos (Fong et al., 1995; Peters et al., 1993). Die Expression der beiden Rezeptoren nimmt bis zum Ende der Embryonalentwicklung ab (*flt-1* ab Tag 16,5 bis Tag 18,5; *KDR* kontinuierlich bis zur Gestation), wobei die *flt-1*-Expression in neugeborenen Mäusen wieder hoch ist (Peters et al., 1993; Millauer et al., 1993).

Endothelzellen weisen eine physiologische Expression beider Rezeptoren z. B. in der Niere auf (Simon et al., 1995), im allgemeinen jedoch wird im adulten Körper in

ruhendem Endothel kaum eine Expression der Rezeptoren gefunden (Millauer et al., 1993). Im Gehirn beispielsweise ist keine VEGF-Rezeptor-Expression nachzuweisen (Plate et al., 1992). Bei der pathologischen Angiogenese, beispielsweise in der Tumorangio-genese bei Brustkrebs und in Carzinomen im Ovar, wurde eine signifikante Hochregulation beider VEGF-Rezeptoren, verglichen mit der Expression im Endothel des umgebenden normalen Gewebes, beobachtet (Boockock et al., 1995; Yoshiji et al., 1996).

Wie bereits erwähnt, wird die VEGF-Expression im wesentlichen durch Hypoxie reguliert (Schweiki et al., 1992). Nomura und Mitarbeiter fanden 1995 eine transiente Expression des *flt-1*-Gens in Perizyten unter hypoxischen Kulturbedingungen. Ebenfalls wurde in hypoxischen Mikrogefäßen von Hautgewebekulturen eine Hochregulation beobachtet (Detmar et al., 1997), ohne allerdings eine Hochregulation des VEGFR-2 zu detektieren. Diese Ergebnisse wurden in Nabelschnur-Endothelzellen bestätigt, die unter hypoxischen Bedingungen VEGFR-1 stärker exprimierten, aber die VEGFR-2-Expression nicht veränderten (Gerber et al., 1997).

Bei Versuchstieren änderte sich unter hypoxischen Bedingungen zwar die Anzahl beider Rezeptoren in der Lunge, jedoch wird dies im Falle des VEGFR-2 auf Faktoren zurückgeführt, die in ischemischen Geweben gebildet werden (Tuder et al., 1995). Unter hyperoxischen Bedingungen wurde bei Ratten eine Verringerung der VEGF-Rezeptor-1 und -2 mRNA gefunden, die nicht nur auf den Rückgang von Endothelzellen zurückzuführen ist (Klekamp et al., 1999).

Weitere Studien ergaben, daß die Mitogene TNF-alpha (Patterson et al., 1996) und TGF-beta (Mandriota et al., 1996) die Expression des VEGFR-2 inhibieren können. VEGF selbst kann VEGFR-1 und sVEGFR-1 in der Zellkultur hochregulieren (Barleon et al., 1997b).

Die unterschiedlichen Expressionsmuster lassen sich durch den unterschiedlichen Aufbau der Promotorregionen der VEGFR-Rezeptor-Gene zurückführen.

In der Promotorregion des *flt-1*-Gens wurde eine einzelne Transkriptions-Initiationsstelle 281bp stromaufwärts des Startcodons identifiziert (Ikeda et al., 1996). Neben einer TATA Box wurden vier GC Boxen, mehrere Ets Motive und eine mögliche Bindestelle für CREB/ATF (cAMP responsive element binding protein/activating transcription factor) in dieser Region nachgewiesen. Dabei wurde gezeigt, daß die Region -229 bis +8 für eine Zelltyp-spezifische Expression verantwortlich ist (Ikeda et al.,

1996), die sich allerdings bis zu einem 1 kb-Fragment in der 5'-flankierenden Region ausweitete (Morishita et al., 1996). Da eine CRE (cAMP responsive element) -Stimulation nicht zu einer Erhöhung der Promotoraktivität führte, reguliert CREB anscheinend den basalen Expressionslevel des *flt-1*-Gens an -74. Eine negative regulatorische Einheit bildet das erste Intron, welches offensichtlich einen Transkriptionsarrest bewirkt (Morishita et al., 1995). Wakiya und Mitarbeiter zeigten 1996, daß ein Ets-Motiv an -54 bis -51 und ein CRE an -83 bis -76 notwendige Komponenten des Promotors darstellen, die gemeinsam die Promotoraktivität regulieren. Eine Hochregulation von Ets-1 nach VEGF-Stimulation, die eine deutliche Korrelation mit der *flt-1*-Expression aufweist, weist auf eine Promotoraktivierung durch Ets hin (Valter et al., 1999). Weiterhin wurde eine erhöhte Promotoraktivität des *flt-1*-Gens unter hypoxischen Bedingungen gezeigt, die durch ein 430 bp langes Fragment in der 5'-flankierenden Region vermittelt wird. Dort wurde eine mögliche Bindungsstelle für HIF (Hypoxia Inducible Factor), beispielsweise HIF-1 und -2, gefunden, wie sie in weiteren Hypoxie-induzierbaren Genen wie *vegf* (Jiang et al., 1996) gefunden wurde (Gerber et al., 1997; Marti et al., 2000). Eine Bindungsstelle für Erg-1 (Early Growth Response Factor-1) wurde mit Hilfe eines Zellkultur-Modells für vaskuläre Verwundbarkeit identifiziert, in dem die Expression von *flt-1* nach Verletzung des Zellmonolayers anstieg (Vidal et al., 2000) (Abb. 1.3).

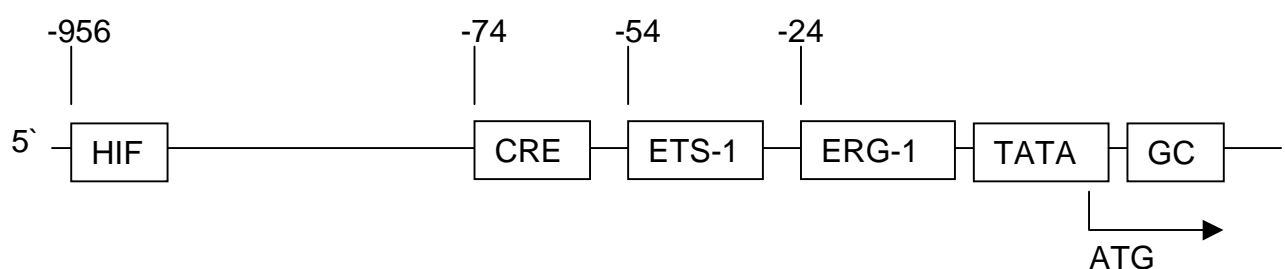


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Promotorregion des *flt-1*-Gens. Gezeigt wird die 5'-flankierende Region des Gens.

Die Promotorregion des *KDR*-Gens wurde erstmals 1995 von Patterson und Mitarbeitern beschrieben, die einzelne Transkriptions-Initiationsstelle befindet sich 303 bp stromaufwärts von dem Initiations-Methionin, und es ist keine TATA-Box vorhanden. Insgesamt wurden in der GC-reichen 5'-flankierenden Region fünf Sp1 Elemente identifiziert. Weiterhin wurden zwei GATA-Elemente identifiziert, die allerdings keine

Einflüsse auf die Promotoraktivität ausüben. An -10 bis +10 befindet sich eine Region mit Inr (initiator element)-Aktivität, deren Mutagenese die Aktivität des Promotor signifikant in transienten Transfektionsassays verringert (Patterson et al., 1997; Wu und Patterson, 1999). Der an Inr-bindende Transkriptionsfaktor TFII-I ist neben dem Inr-Element notwendig für die Transkription des Promotors. Die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 spielen in einem reguliertem Verhältnis zueinander eine wichtige Rolle in der *KDR*-Promotoraktivität. Während Sp1 die Aktivität in der Region -79 bis -68 vermittelt, kann Sp3 diese abmildern, so daß die Ratio Sp1/Sp3 den Promotor reguliert (Hata et al., 1998). Im Gegensatz zu dem *flt-1*-Promotor ist der Transkriptionsfaktor Ets-1 in Verbindung mit der *KDR*-Promotoraktivität nicht exprimiert (Valter et al., 1999). 2000 wurde von Illi und Mitarbeitern beschrieben, daß CREB (cAMP responsive element binding protein) und NF- κ B (nuclear factor- κ B) einen gegensätzlichen Effekt auf die regulatorische Aktivität des Promotors ausüben. Sie binden an die Regionen +11 bis +18 für CRE (cAMP responsive element) für einen abschwächenden und -62 bis -65 für κ B-RE (κ B-responsive element) für einen aktivierenden Effekt (Abb. 1.4).

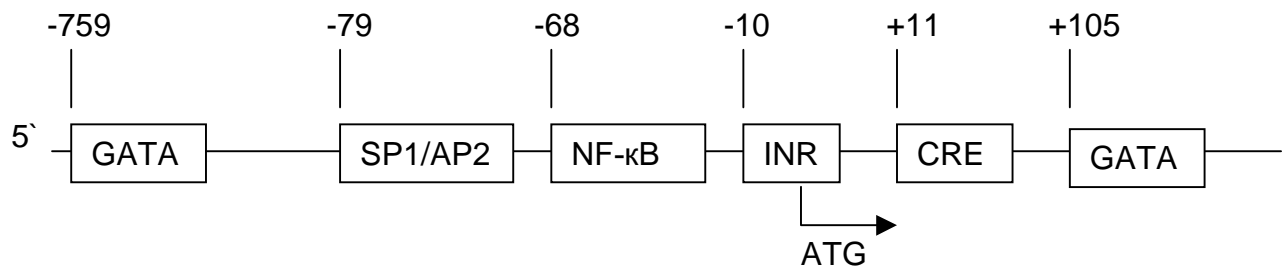


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Promotorregion des *KDR*-Gens. Gezeigt wird die 5'-flankierende Region des Gens.

Nicht nur die Tyrosin Kinasen der VEGF-Rezeptoren sind wichtig für die Gefäßbildung und auf das vaskuläre Endothel beschränkt, sondern auch die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Tie-1 und Tie-2/Tek. Sie bilden eine weitere Gruppe von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, deren Expression sich ebenfalls ausschließlich auf Endothelzellen beschränkt, und scheinen eine Rolle im Aufbau und Erhalt der Blutgefäße zu spielen (Sato et al., 1994).

Liganden für den Tie-1 Rezeptor sind bislang nicht identifiziert worden. Als Liganden des Tie-2 sind die Angiopoietine 1 bis 4 bekannt, die die Balance zwischen den Endothelzellen und den Perizyten regulieren (Vandenbunger, 1997). Embryonen, die

kein Angiopoietin-1 (Ang-1) exprimieren, weisen die gleichen strukturellen Abnormalitäten auf wie die Tie-2^{-/-} Mäuse (Suri et al., 1996). Ein natürlich vorkommender Antagonist von Ang-1, genannt Angiopoietin-2 (Ang-2), blockiert die Aktivierung von Tie-2 mit Ang-1 (Maisonpierre et al., 1997).

1.4 Das Corpus luteum und die Granulosazellen als Beispiel einer physiologischen Angiogenese

Zu den wenigen physiologischen Vorgängen mit aktiver Angiogenese im adulten Körper zählen die vier verschiedenen Prozesse im weiblichen Reproduktionssystem: Follikelreifung, Aufbau des Endometriums, Aufbau der Corpus luteums (Gelbkörper) und Implantation des Embryos.

Das Corpus luteum ist eine vorübergehend tätige endokrine und parakrine Drüse im Ovar, deren Syntheseprodukte für die Aufrechterhaltung einer normalen Schwangerschaft notwendig sind (Niswender et al., 1995). Das Corpus luteum wird nach der Ovulation aus den verbleibenden Granulosa- und Thekazellen des gesprungenen Follikels gebildet.

Im menschlichen Ovar der Prämenopause befinden sich Follikel in verschiedenen Entwicklungsstadien der Reifung. Die Reifung eines Primordialfollikels zu einem Sekundärfollikel findet Gonadotrophin unabhängig statt. In diesem Stadium des Follikels liegt die Oozyte, die von einer azellulären Zona Pellucida umgeben ist, in einem mehrschichtigen Follikelepithel. Dieses Epithel ist avaskulär und besteht aus Granulosazellen, die über Gap junctions die Oozyte versorgen. In dem heranreifenden Follikel umgibt eine Basalmembran die Oozyte und die Granulosazellen, die wiederum mit einer gut durchbluteten Thekazellenschicht (Theka interna) umgeben sind. Die weitere Reifung des Follikels zum antralen und Graafschen Follikel ist nun von den Gonadotropinen der Hypophyse abhängig. Unter weiterem Einfluß von Hormonen (Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und Östradiol) wächst die Oozyte weiter heran, bis die Ovulation des führenden Follikels durch eine Erhöhung der Konzentration des luteinisierenden Hormons (LH) ausgelöst wird. Der Cumuluskomplex wird von den Fimbrien der Eileiter aufgenommen. Die verbliebenen Zellen des Follikels differenzieren zu Granulosalutein- und Thekaluteinzellen (Channing et al., 1970). Die zur Proliferation nötigen Endothelzellen sprossen nun aus der Thekazellschicht in den ovulierenden Follikel ein und

ermöglichen die Bildung des Corpus luteum aus den verbliebenen Granulosazellen (McClure et al., 1994). Das Corpus luteum produziert durch die Granulosaluteinzellen Östradiol und vor allem Progesteron. Durch das schnelle Einsprossen der Blutgefäße können diese synthetisierten Hormone zu den Zielorganen wie Endometrium gelangen. Im Falle einer Schwangerschaft hält das embryonale hCG (humanes Choriongonadotropin) die Progesteronsynthese aufrecht, bis nach spätestens der neunten Schwangerschaftswoche die Plazenta diese Funktion übernimmt. Ohne eine Schwangerschaft dedifferenzieren die Zellen des Corpus luteum zum Corpus albicans, und im Ovar bleibt eine vernarbte Stelle zurück (Abb.1.5).

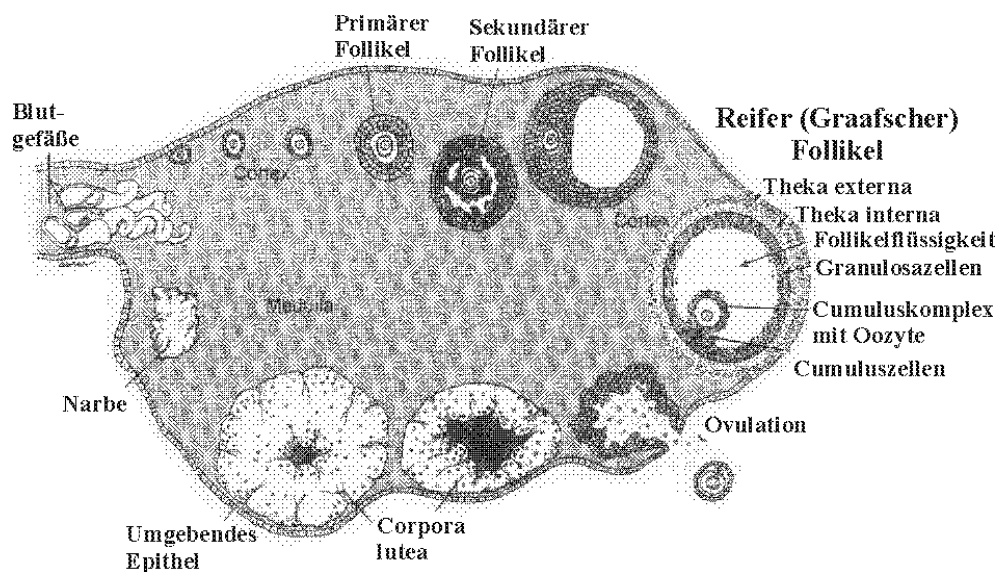


Abb.1.5: Morphologie des Ovars. Schema der ovariellen Strukturen und ihrer Veränderungen während des Menstruationszykluses (aus: Junqueira et al., Basic Histology, Appleton & Lane, 1995).

Eine VEGF-Synthese im Follikel ist in den ersten Stadien nicht vorhanden. In den Thekazellen beginnt erst nach dem Stadium des Primärfollikels eine VEGF-Synthese, die die Endothelzellen des ovariellen Stromas zur Proliferation anregt. Diese bilden ein dichtes Kapillarnetz um den Follikel (Yamamoto et al., 1997). In den Granulosazellen steigt die VEGF-Expression ebenfalls an, wodurch vermutlich die Permeabilitätserhöhung der Gefäße in der Theka interna eine Ansammlung von Follikelflüssigkeit bewirkt (Kamat et al., 1995). Gleichzeitig mit dem die Ovulation auslösenden LH-Anstieg wird die VEGF-Produktion in den Granulosazellen erhöht. Die Endothelzellen steigern ihre Proliferationsrate und wandern in das junge Corpus luteum ein. Ohne eine

Schwangerschaft gehen die VEGF-synthetisierenden Zellen im Corpus albicans zugrunde (Kamat et al., 1995; Yamamoto et al., 1997).

Die Rolle von VEGF im Ovar wurde mit Hilfe der löslichen Form des VEGFR-1 im Rattenmodell mit hormonell indizierter Ovulation beobachtet. Ferrara und seine Mitarbeiter zeigten 1998, daß die Behandlung mit rekombinantem sVEGFR-1, bestehend aus den Domänen 1 bis 3, offensichtlich die Angiogenese im Corpus luteum zu einem großen Teil inhibierte. Durch eine Bindung des sVEGFR-1 an VEGF war die Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors herabgesetzt und die Angiogenese im Corpus luteum wurde nahezu vollständig unterbunden. Dieses wurde deutlich durch eine Inhibition der Corpus luteum-Entwicklung und der Progesteron-Freisetzung sowie der Bildung eines unvollständigen Endometriums mit ischemischen Teilen.

1.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Fragestellungen zur Angiogenese im jungen Corpus luteum geklärt werden, wobei Zellkulturexperimente genutzt werden sollten, um die Situation im Ovar *in vitro* nachzustellen. Denn Funktionsstörungen des Corpus luteums zählen zu den häufigsten Ursachen weiblicher Infertilität.

Angiogenese wird hauptsächlich durch den Endothelzell-spezifischen Wachstumsfaktor VEGF vermittelt, dessen Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, auf Endothelzellen exprimiert werden (Shibuya et al., 1991; Terman et al., 1991).

Verschiedene humane primäre Endothelzellen sollten auf ihre VEGF-Rezeptorausstattung untersucht werden, wobei die Expression der Rezeptoren sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene analysiert werden sollte. In Stimulierungsexperimenten mit Wachstumsfaktoren und Hormonen sollten Fragestellungen zur Regulation der Rezeptoren analysiert werden.

Von Interesse bei der Vaskularisierung des Corpus luteums ist weiterhin der direkte Einfluß von Granulosazellen auf die Expression der VEGF-Rezeptoren. Experimente mit Granulosazell-Überständen sowie Kokulturen mit Granulosazellen und Endothelzellen sollten Aufschluß über die Expression der VEGF-Rezeptoren geben. Möglicherweise könnten von den Granulosazellen gebildete Faktoren, die diese Expression beeinflussen, charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Grundchemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) von den folgenden Herstellern bezogen:

- Merck, Darmstadt,
- Riedel-de Haen AG, Seelze,
- Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg,
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen.

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit deionisiertem, über eine Milli-Q UF Plus Filteranlage (Millipore Co., Bedford, England) aufgereinigtem Wasser (Milli-Q) angesetzt. Die für die Zellkultur verwendeten Lösungen und Medien wurden autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min) oder über Minisart NML Filter (0,2 µm, Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert.

Die Zusammensetzungen der jeweils verwendeten Lösungen und Medien sind unter den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.2 Zellkultur

Alle im folgenden beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C und mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

Zur Kontrolle und Beobachtung der Zellkulturen wurde ein Inversmikroskop TMS (Nikon, Japan) mit 40- und 100-facher Vergrößerung eingesetzt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Einwegkulturschalen und -pipetten wurden von NUNC (Roskilde, Dänemark) bezogen.

2.2.1 Humane primäre Endothelzellen

Humane primäre Endothelzellen:

- Humane Nabelschnurvenen Endothelzellen (HUVE-Zellen), Passagen 3 bis 12;
- Dermale mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Vorhaut (HDME-Zellen), Passagen 4 bis 10;
- Mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem Myometrium (UtMVE-Zellen), Passagen 4 bis 10 (alle Zelltypen CellSystems, St. Katharinen);
- HUVE-Zellen, selbstisoliert aus Nabelschnüren (Frauenklinik Celler Straße, Städtisches Krankenhaus, Braunschweig, Frau Dr. Müller-Joch. Die Verwendung der Nabelschnüre wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover genehmigt.), Passagen 1 bis 12.

Alle verwendeten Endothelzellen waren von mehreren Spender isoliert und anschließend gepoolt worden, so daß eine Zellkultur stets ein Mischung aus Zellen verschiedener Spender waren. Als Ausnahme wurden HDME-Zellen von einem einzigen Spender verwendet.

Medien:

- Wachstumsmedium für HUVE-, HDME- und UtMVE-Zellen: EGM-2 MV (CellSystems, St. Katharinen) mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS);
- Mangelmedium: EBM (CellSystems, St. Katharinen) mit 2,5 % FCS.

Das Wachstumsmedium wurde mit den mitgelieferten Wachstumsfaktoren wie VEGF, hFGF (humaner Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) und hEGF (humaner Epidermal Growth Factor) supplementiert.

Die Endothelzellen wurden in Wachstumsmedium kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen nach einmaligem Spülen mit HBSS (CellSystems, St. Katharinen) mittels Trypsin/EDTA (CellSystems, St. Katharinen) abgelöst und nach Neutralisation mit TNS-Lösung (CellSystems, St. Katharinen) und Zentrifugation (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, 280 x g, 5 min) erneut ausplattiert. Dabei wurden die Zellen 1:2 bis 1:5 verdünnt in Medium in Kulturgefäßen (NUNC, Roskilde, Dänemark) ausgesät.

2.2.2 Humane Zellen und Zelllinien

Neben den Endothelzellen wurden auch andere humane Zellen kultiviert und in VEGF-Rezeptor-Studien eingesetzt. Diese Zellen wurden in Kokultorexperimenten mit Endothelzellen verwendet, wobei das Kulturmedium aus Wachstumsmedium der Endothelzellen bestand, das mit 30 % jeweils anderem Medium (Gibco BRL, Karlsruhe) supplementiert war.

Humane primäre Gingiva-Fibroblasten: Die Zellen wurden aus Punktionen des Kieferknochens isoliert und wurden freundlicherweise von Herrn Stefan Czichos überlassen. Zur Kultivierung dieser Zellen wurde DMEM-Medium verwendet, das mit 15 % FCS, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (Medium und Supplemente: Gibco BRL, Karlsruhe) supplementiert war.

HFOB: Diese Zelllinie wurde aus Osteoblasten-Vorläuferzellen etabliert und ist temperaturabhängig differenzierbar (Hofbauer et al., 1998). Bei 33°C Kultivierungstemperatur findet keine Differenzierung statt, bei einer Temperatur von 37°C differenzieren die Zellen zu Osteoblasten (Hofbauer et al., 1998). Diese Zellen mit Kultivierungsmedium (DMEM, 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin; Medium und Supplemente: Gibco BRL, Karlsruhe) wurden von Herrn Helge Bertram zur Verfügung gestellt.

HO-23: Diese Zelllinie wurde aus humanen Granulosazellen etabliert (Hosokara et al., 1998) und unserer Arbeitsgruppe von Dr. A. Amsterdam (Rehovot, Israel) überlassen. Das Kulturmedium war eine 1:2 Mischung aus DMEM und Ham's F12 und einer Zugabe von 5% FCS, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (Medium und Supplemente: Gibco BRL, Karlsruhe).

Zur Herstellung der konditionierten Medien von HO-23-Zellen oder Granulosazellen wurden die Zellen 48 Stunden in dem für sie beschriebenen Medium kultiviert. Der Zellüberstand wurde anschließend zentrifugiert (5 min, 500 x g) und bei -20°C tiefgefroren.

2.2.3 Isolation von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene

Die humanen Nabelschnüre zur Isolation der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVE-Zellen) wurden direkt nach der Abnabelung des Kindes in sterilen Gefäßen bei 4°C gelagert und innerhalb von 72 Stunden verarbeitet. Die Nabelschnüre wurden durch fixierte Knopfkanülen mit vorgewärmten Cordpuffer (PBS, 10 mM D-Glukose) gespült und mit Enzymlösung (Protease, Sigma, 0,25 g/100 ml in Cordpuffer, dialysiert ü. N. gegen Cordpuffer) gefüllt und in 37°C temperierter Ringerlösung (6 g/l NaCl, 0,3 g/l KCl, 0,2 g/ml CaCl_2) inkubiert. Nach 30 min wurden die abgelösten Zellen mittels Cordpuffer aus der Vene gespült, abzentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, 280 x g, 5 min) und in Wachstumsmedium kultiviert. Diese Zellen der Passage 0 wurden nach dem Anheften mit PBS gewaschen, um verbliebene Erythrozyten herauszuwaschen und bis zur Konfluenz kultiviert.

Zur Verifizierung der Endothelzellen wurde in einer späteren Passage eine immunhistologische von-Willebrand-Faktor Färbung vorgenommen.

2.2.4 Immunfluoreszenz mit anti-von-Willebrand-Faktor Antikörper zur Spezifizierung von Endothelzellen

Um zu gewährleisten, daß es sich bei den selbst isolierten Zellen um Endothelzellen handelt, wurden die Zellen einer Immunfärbung mit dem Endothelzell-Marker von-Willebrand-Faktor unterzogen. Die 70 bis 100 % konfluenten Zellen wurden 3 x mit warmen PBS gespült und zur Fixierung bei Raumtemperatur mit Methanol/0,3 % Wasserstoffperoxid überschichtet. Nach 10 min wurden die Zellen mehrmals mit PBS/0,1 % Tween-20 zur Membranperforierung gewaschen und die unspezifischen Bindungen 10 min bei Raumtemperatur mit 2 % BSA in PBS blockiert. Danach erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers (Maus-anti-human von-Willebrandt-Faktor, Klon F8/86, DAKO, Dänemark) für 45 min bei 37°C (1:200 verdünnt in 0,1 % BSA in PBS). Nach erneutem Waschen mit PBS folgte die 30-minütige Inkubation bei 4°C mit dem Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus, TRITC konjugiert, Dianova, Hamburg, 1:250 verdünnt in PBS). Zur Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI-Lösung (Boehringer Mannheim) wurden die Zellen nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper 1 x mit DAPI/Methanol (1 µg/ml) gewaschen und 15 min bei 37°C mit dieser Lösung inkubiert.

Nach weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Proben trockengetupft und mit dem ProLongTM Antifade Kit (MoBiTec, Göttingen) Deckgläschen aufgeklebt. Nach dem Trocknen über Nacht konnten die Präparate im Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Bremen) betrachtet werden. Dabei wurden die TRITC-Präparate mit einer Wellenlänge von 580 nm (Grünanregung, 580 nm, LP 590, Präparat erscheint rot) angeregt und die Zellkerne, die mittels DAPI angefärbt waren, mit der Wellenlänge von 280 nm betrachtet. Die Immunfluoreszenz-Präparate wurden auf Sensia II-Filme (400 Asa, Fujichrome, Japan) fotografiert.

2.2.5 Kryokonservierung von humanen Zellen

Zur Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl und Zentrifugation (280 x g, 5 min) wurden sie in eiskaltes Kryomedium aufgenommen, das aus 80 % Kulturmedium, 10 % FCS und 10 % DMSO, bestand. Es wurden 1 ml Aliquots dieses Mediums mit 3 bis 6 x 10⁵ Zellen hergestellt und diese langsam (1°C/min) auf -70°C abgekühlt. Anschließend konnten die kryokonservierten Zellen unbegrenzt in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut und in Kulturmedium ausgesät. Nach dem Anheften wurde das DMSO-haltige Medium durch Kulturmedium ersetzt und die Zellen wie beschrieben kultiviert.

2.2.6 Mitogenassays mit Endothelzellen

Mit Hilfe von Mitogenitätstests wurden die Reaktion der humanen Endothelzellen auf verschiedenen Faktoren und Zytokine untersucht.

Die Zellen wurden mit 3000 Zellen pro Loch einer 48-Loch-Schale in Wachstumsmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen nach 3 x mit PBS gewaschen danach in Mangelmedium inkubiert. Nach etwa 18 Stunden wurden die Zellen erneut gewaschen und mit verschiedenen Faktoren und Zytokinen behandelt, die in Mangelmedium verdünnt zugesetzt wurden. Die jeweilige Verdünnungsstufe wurde in Triplikaten angesetzt.

Proliferationassay: Die Reaktion der Zellen wurde durch Bestimmung der Zellzahl ermittelt. Die Zellen wurden nach 4 bis 5 Tagen Kultivierung in unterschiedlich zusammengesetzten Medien 1 x mit PBS gewaschen, mittels Trypsin/EDTA (Gibco BRL, Karlsruhe) abgelöst und im Casy II (Schärfe Systeme) gezählt.

DNA-Synthese-Assay: Die Stimulierbarkeit der Zellen wurde durch die Aufnahme und den Einbau radioaktiv-markierten Thymidins ermittelt, in dem die lysierten Zellen auf ihre radioaktive Strahlung untersucht wurden.

Nach 18 Stunden Kultur der Zellen in zytokinhaltigem Medium wurde 1 μCi [methyl- ^3H]Thymidin/ml (Amersham, Life Science, Braunschweig) zugegeben und für weitere 6 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 2 x 5 min fixiert. Nach weiteren 2 x 10 min Inkubation mit 5 % TCA-Lösung wurden die Zellen kurz mit Wasser gewaschen und in 0,3 M Natronlauge gelöst. Dieses Zellysate wurde mit Quicksafe A Szintillationslösung (Zinsser Analytic, Maidenhead, England) vermischt und im Szintillationszähler LS 6000IC (Beckmann, München) vermessen.

2.2.7 Stimulation mit Zytokinen und Faktoren

Die Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium kultiviert und nach mehrmaligem Waschen mit PBS in Mangelmedium weiterkultiviert. Nach der Inkubation in Mangelmedium über Nacht wurde der Zellrasen erneut mit PBS gewaschen und neues Mangelmedium zugesetzt. In dieses Medium wurden die zu untersuchenden Faktoren pipettiert und die RNA zu verschiedenen Zeitpunkten (zwischen 0 und 48 Stunden) isoliert.

Die Stimulationsexperimente mit Überständen von Zellkulturen wurden ebenfalls auf konfluenten Endothelzellen durchgeführt. Die Negativkontrolle zu dem von Zellen konditionierten Medium war stets das unkonditionierte Medium.

Die verwendeten Faktoren ließen sich in drei verschiedene Gruppe unterteilen:

- (1) VEGF-Rezeptoren-bindende Wachstumsfaktoren sowie bFGF,
- (2) Zytokine und Faktoren,
- (3) Hormone.

In Gruppe (1) wurden eingeteilt: VEGF₁₂₁ (R&D Systems, Wiesbaden), VEGF₁₆₅ und PlGF-2 (eigene Arbeitsgruppe, rekombinant in BaculoVirus-System hergestellt) sowie bFGF (basic Fibroblast Growth Factor; Strathmann, Hannover).

Gruppe (2) bestand aus aFGF (acidic Fibroblast Growth Factor: R&D Systems, Wiesbaden), Il-1 alpha (Interleukin-1 alpha) und Il-1 beta (Interleukin-1 beta) und Il-6 (Interleukin-6; Strathmann, Hannover), Inhibin A (R&D Systems, Wiesbaden) sowie Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA von SIGMA Aldrich, Deisenhofen).

Die Gruppe (3) setzte sich aus LH (Luteinisierendes Hormon, Serono, Unterschleissheim), hCG (humanes Choriongonadotropin, Serono, Unterschleissheim) sowie Progesteron und Östradiol zusammen.

Dabei handelt es sich stets um rekombinante humane Proteine und synthetische Steroidhormone.

2.2.8 Gewinnung von Granulosazellen aus Follikelpunktaten und Nachweis der Inhibin-Synthese

Das Zellmaterial wurde einem Kollektiv von Patientinnen entnommen, die in der Kinderwunschsprechstunde der Frauenklinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der RWTH Aachen in Behandlung waren und am In Vitro Fertilisationsprogramm (IVF) teilnahmen.

Nach der hormonellen Stimulation der Patientinnen zur transvaginalen Punktion der stimulierten Follikel wurde die in Routineeingriffen gewonnene Follikelflüssigkeit zur Granulosazellgewinnung genutzt. Die Follikelpunktionsflüssigkeiten enthielt nach Entnahme der Cumuluskomplexe neben den Granulosazellen auch Blut- und vaginale Epithelzellen sowie kleinere Blutgefäße.

Zur Isolation der Granulosazellen wurden die pelletierten Zellen mehrfach mit isotonischem Waschpuffer (steriles PBS mit 1 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, FCS für humane Amnionzellen, Seromed Biochrom) zur Entfernung der Blut- und Epithelzellen gespült und erneut zentrifugiert (Universal 16 Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen). Nach dem letzten Waschschrift erfolgte eine Hyaluronidase (Type VI-S, SIGMA)-Behandlung in einem kleinen Volumen (20 IU/ml). Das Enzym löst durch Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix die Zellverbände auf und es entstehen Zellcluster von 5 bis 10 Zellen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 10 min und wurde durch

Zugabe von einem Überschuß an Waschpuffer gestoppt. Die vereinzelt Zellen wurden auf einen 50 % Percoll-Gradienten (PBS:Percoll, 1:2; Dichte 1,124 g/ml, Seromed Biochrom) pipettiert und für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Im Pellet befanden sich Erythrozyten, während die Granulosazellen als gräuliche Interphase zwischen PBS und Percoll entnommen werden konnten. Die Zellen wurden mehrmals in Kulturmedium gewaschen und ausplattiert.

Als Kulturmedium diente M199 mit Earle's Salzen (Seromed Biochrom), das mit 1 % L-Glutamin (Seromed Biochrom), 1 % Genatmycin (Seromed Biochrom) und 10 % FCS versetzt wurde.

Zur Identifizierung der Granulosazellen wurden nach drei Tagen der Kultivierung ein Nachweis der Inhibin-Synthese durch eine Immunfluoreszenz-Färbung mit einem monoklonalem anti-Inhibin Antikörper durchgeführt.

Die kultivierten Granulosazellen wurden nach gründlichem Waschen mit PBS für 25 min in 3 % Paraformaldehyd in PBS bei 4°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden erneut gewaschen, 30 min in 0,1 % Triton X-100/PBS inkubiert und nach weiteren Waschschritten wurden mit 0,2 % BSA in PBS über Nacht bei 4°C die unspezifischen Bindungen blockiert. Zum Inhibin-Nachweis wurde der monoklonale Maus-anti-human Inhibin-alpha Antikörper (MCA 951S, Serotec, Biozol, Eching) eingesetzt. Er wurde 1:10 verdünnt in 0,1 % BSA in PBS für 4 Stunden auf den Zellen bei 4°C inkubiert. Zur Detektion des anti-Inhibin-Antikörpers wurde der Ziege-anti-Maus-Antkörper (Ziege-anti-Maus, TRITC konjugiert, Dianova, Hamburg, 1:50 verdünnt in 0,1 % BSA in PBS) für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit DAPI eine Gegenfärbung vorgenommen (2.2.4). Die Präparate wurden wie die markierten Endothelzellen dokumentiert (2.2.4).

2.3 Kokultur humaner Endothelzellen mit Granulosazellen

Die Granulosazellen waren stets frisch isoliert oder kryokonserviert, die Endothelzellen befanden sich zwischen Passage 3 und Passage 8.

Direkte Kokultur: Bei der direkten Kokultur wurden die beiden Zelltypen in einem Kulturgefäß direkt nebeneinander kultiviert. Die Granulosazellen wurden in

Granulosazellmedium ausgesät und nach dem Anhaften langsam an das Endothelzellmedium adaptiert. Die abgelösten Endothelzellen wurden nach 24 Stunden in das mit Granulosazellen bewachsene Kulturgefäß gegeben und die Kokulturbedingungen nach Anheften der Endothelzellen eingestellt.

Indirekte Kokultur: Unter indirekten Kokultivierungsbedingungen wurden die Zellen in dem selben Kulturgefäß kultiviert, allerdings wurden sie durch eine Membran getrennt, die für das Medium durchlässig war. Dazu wurden die Granulosazellen in sogenannten TransWell-Einheiten (NUNC, Roskilde, Dänemark) ausgesät, die anschließend in Multi-Loch-Platten mit Endothelzellen gesetzt wurden. Nach Beendigung des Versuches wurden die Überstände oder die Endothelzellen weiter verwendet und der Rest verworfen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolierung wurde das TRIzol-Reagenz (Gibco BRL, Karlsruhe), eingesetzt und wie vom Herstellern empfohlen verwendet, um die RNA nach der `single-step` Methode nach Chomzynski und Sacchi (1987) zu gewinnen.

Aus adhärend wachsenden Zellkulturen: Nach dem Wachstum der Zellen bis zur Konfluenz wurde das Medium sorgfältig entfernt und pro 10 bis 25 cm² Wachstumsfläche 1 ml TRIzol-Reagenz zugegeben. Die TRIzol-Zelllösung wurde nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur aufgearbeitet oder bei -70°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Die aufgetaute TRIzol-Lösung wurde mit 200 µl Chloroform versetzt, sofort 15 sec geschüttelt und bei 4°C mit 20 000 x g 15 min (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase entnommen und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA mittels Zentrifugation (4°C, 10 min, 20 000 x g) pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und im Exikkator getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl nukleasenfreiem Wasser

gelöst und unter Zugabe von 250 µl 96 % Ethanol und 10 µl 2 M Natriumacetat, pH 5,5, mindestens 30 min bei -70°C präzipitiert.

Zur Quantifizierung wurden jeweils 10 µl der RNA-Suspension nach Schütteln entnommen, mit 96 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach dem Lösen in Wasser wurde die Optische Dichte bei 260 und 280 nm im Photometer (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Schweden) bestimmt. Dabei entspricht 1 OD₂₆₀ der Menge von 40 µg/ml RNA.

2.4.2 Elektrophoretische Auftrennung der RNA in Formaldehyd-Gelen

Zur Auftrennung der RNA in denaturierenden Agarosegelen wurde ein 1,25 % Agarose-Oberflächenspannungsgel (1 g Agarose, 14,2 ml Formaldehyd 37 %, 8 ml 10 x MOPS und 60 ml Wasser) angefertigt. Für die RNA-Proben wurde die entsprechende Menge der RNA-Suspension pelletiert (3 bis 10 µg RNA) und in 2 µl DEPC-behandeltem H₂O gelöst. Nach Zugabe eines Probenpuffers (1 µl 10 x MOPS, 1 µl 400 µg/ml Ethidiumbromid, 2 µl 37% Formaldehyd, 5 µl Formamide) wurde die RNA bei 65°C für 10 min denaturiert, anschließend sofort auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 0,7 µl Ladungspuffer (2,5 mg/ml Bromphenolblau in 50 % Glycerol und 10 mM EDTA) auf das Gel geladen. In 1 x MOPS-Puffer (10 x MOPS: 0,2 M MOPS, 10 mM NaAc, pH 7,0, 10 mM EDTA) wurden die Proben bei 66 V in einer abgedunkelten Laufkammer (Bioplex, Freiburg) mit zirkulierendem Laufpuffer elektrophoretisch über 3 bis 5 Stunden aufgetrennt.

2.4.3 Northern Blotting

Um die RNA auf eine Nylon-Membran (Hybond N, Amersham Life Science, Braunschweig) zu transferieren, wurde ein Kapillarblotting durchgeführt. Das Gel wurde nach Beurteilung der RNA unter UV-Licht für 10 min in 20 x SSC (1,5 M Natriumchlorid, 150 mM Natriumcitrat, pH 7,0) äquilibriert. Zum Transfer der RNA wurde das Gel auf eine Filterpapierbrücke gelegt, deren Enden in 10 x SSC tauchten. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit einer dicken Schicht saugfähigem Filterpapier überschichtet, das mit einem Gewicht von etwa 200 g beschwert wurde. Am nächsten Tag wurde die RNA auf der Membran in 2 x SSC gewaschen und mit Hilfe eines

UV-Linkers (120 000 μ Joules, UV Stratalinker 2400, Stratagene) fixiert. Die Membran wurde bis zur Hybridisierung trocken aufbewahrt.

2.4.4 Herstellung der Hybridisierungssonden

Zur Herstellung der Hybridisierungssonden zur Northern Hybridisierungen wurden cDNA-Fragmente aus Plasmiden mit Restriktionsenzymen (NEB Biolabs, New England) herausgeschnitten und nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung mit dem JetSorb-Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) aus dem Agarosegel isoliert.

flt-1-Sonde: Das 1,05 kb-Fragment, bestehend aus den Nukleotiden 172 bis 1231 der publizierten humanen cDNA-Sequenz, wurde mit Eco RV und Not I aus einem Expressionsvektor mit der kompletten cDNA-Sequenz herausgeschnitten.

KDR-Sonde: Das 1,4 kb-Fragment besteht aus den Nukleotiden 360 bis 1720 der publizierten humanen cDNA-Sequenz. Es wurde mit Bgl II aus dem Expressionplasmid mit der kompletten cDNA-Sequenz herausgeschnitten.

GAPDH-Sonde: Das 1,2 kb cDNA-Fragment für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) wurde uns freundlicherweise von Herrn Bernhard Barleon überlassen.

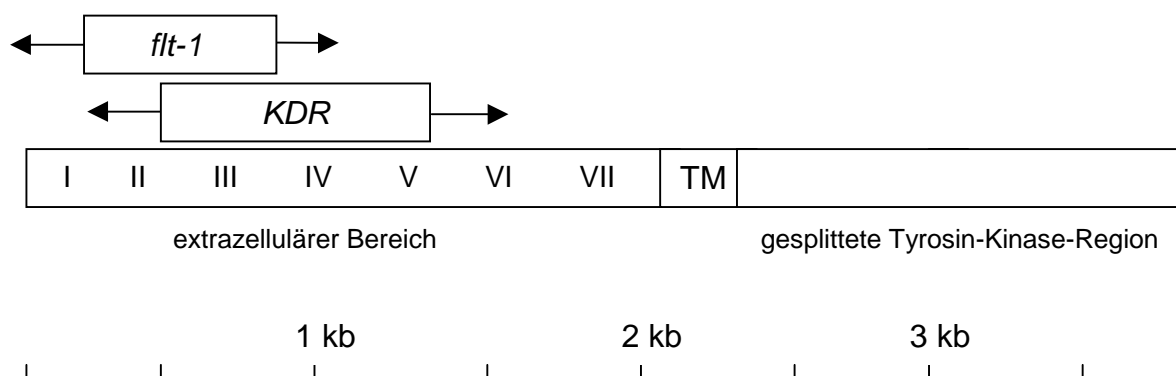


Abb. 2.1: Übersicht der humanen cDNA-Sonden für die VEGF-Rezeptoren zur Northern Hybridisierung.

Nach Beendigung des Restriktionsverdau wurden die Ansätze gelelektrophoretisch Aufgetrennt (2.4.9). Die Anwendung des JetSorb-Kits (Genomed, Bad Oeynhausen) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration der isolierten Fragmente wurde photometrisch ermittelt.

2.4.5 Radioaktive Markierung von cDNA Sonden

Das cDNA-Fragment, das als Sonde (Einsatz 50 ng) diente, wurde in 30 µl nuklease-freiem H₂O kurz denaturiert und auf Eis mit den Komponenten des Prime-a-Gene-Labeling-Systems (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben vermischt. Die Radioaktivität wurde in Form von 50 µCi [α ³²P-] dCTP (Amersham, Life Science, Braunschweig) zugegeben. Nach Abstoppen der Reaktion wurde die Sonde von den ungebundenen Nukleotiden gereinigt, indem der Sonden-Mix auf eine NAP-5 Säule (Pharmacia Biotech, Schweden) gegeben wurde. Die radioaktiv-markierte Sonde wurde mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA) in 250 µl Schritten eluiert. In Aliquots der eluierten Fraktionen wurde mit dem β -Counter LS 6000IC (Beckmann, München) die Cerenkow-Strahlung bestimmt und die Einbaurate der radioaktiven Nukleotide errechnet. Bei einer Strahlung von 6 bis 9 x 10⁹ dpm/µg DNA wurde die Sonde nach einem weiteren Denaturierungsschritt (2 min, 95°C) zur Hybridisierung eingesetzt.

2.4.6 Northern Hybridisierung

Die Hybridisierungen wurden stets unter stringenten Bedingungen (65°C) über Nacht im Hybridisierungssofen (Hybridization Incubator 310, Robins Scientific) durchgeführt. Die mit Wasser angefeuchteten Membranen wurden im Prähybridisierungs-Mix (2 x SSC, 10 x Denhard (0,2 % Ficoll, 0,2 % BSA, 0,2 % Polyvinylpyrrolidone, 5 % Dextransulfat, 0,1 % SDS, 0,1 % N₂P₂O₇, 2 mM EDTA, 100 µg/ml Heringsperma-DNA) mindestens 1,5 Stunden bei 65°C inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer erneuert und die denaturierte Sonde hinzugegeben.

Nach der Inkubation über Nacht wurden die Membranen mit vorgewärmten Waschpuffern gewaschen. Jeweils 2 x 15 min mit den Puffern: I (2 x SSC, 0,1 % SDS,

0,1 % $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM EDTA), II (1 x SSC, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA), III (0,4 x SSC, 0,1 % SDS, 2 mM EDTA). Die gewaschenen Blots wurden 5 bis 8 Stunden auf einem PhosphorImageScreen (Molecular Dynamics) gelegt und dieser mit dem PhosphorImager Strom 860 (Molecular Dynamics) analysiert. Eine quantitative Auswertung der Expression wurde mit dem Programm ImageQuant Versin 5.0 (Molecular Dynamics) durchgeführt.

Eine Rehybridisierung mit einer anderen Sonde wurde vorgenommen, nachdem die zuvor verwandte radioaktiv-markierte Sonde nicht mehr detektierbar war.

2.4.7 cDNA-Synthese

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase (Gibco BRL, Karlsruhe) wurden die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. 5 µg RNA wurden pelletiert und in 10 µl Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1 µl Oligo dT₍₁₂₋₁₈₎-Primer (0,5 µg/µl, Gibco, BRL) wurde die Probe auf 72°C erhitzt und nach 10 min Inkubation auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe des Reaktionsmixes bestehend aus 4 µl 5 x Puffer, 2 µl 0,1 M DTT (Gibco BRL, Karlsruhe) und 1 µl dNTPs (je 10 mM, Pharmacia Biotech, Schweden, Rockford, USA) wurde nach einem kurzen Erhitzen auf 37°C 1 U Enzym (SuperscriptTM RNase H⁻ReverseTranscriptase, Gibco BRL, Karlsruhe) zugegeben. Nach 1,5 Stunden Inkubation und Zugabe von 40 µl TE 10/01-Puffer wurde das Enzym durch eine Erhitzung auf 95°C für 10 min inaktiviert.

2.4.8 RT-PCR

Verwendete RT-PCR-Primer:

Primer: VEGFR-1: (Banks et al., 1998):

A: GCA CTA CAG TAT TAG CAA GCA A

B: ACT GAG GTT TCG CAG GAG GTA T

Annealingtemperatur: 55°C

Produktgröße: 310 bp

Primer: sVEGFR-1: (Primer A: Kendall et al., 1996; Primer B wurde von Frau Dr. Kathleen Greger zur Verfügung gestellt; die Primersequenz wurde mit der NCBI-Datenbank abgeglichen):

A: GCA CCT TGG TTG TGG CTG AC

B: CGG ATT TCT TAA TGT TTT ACA TTA CTT TGT GTG G

Annealingtemperatur: 62°C

Produktgröße: 500 bp

Primer: VEGFR-2: (Hewett & Murray, 1996):

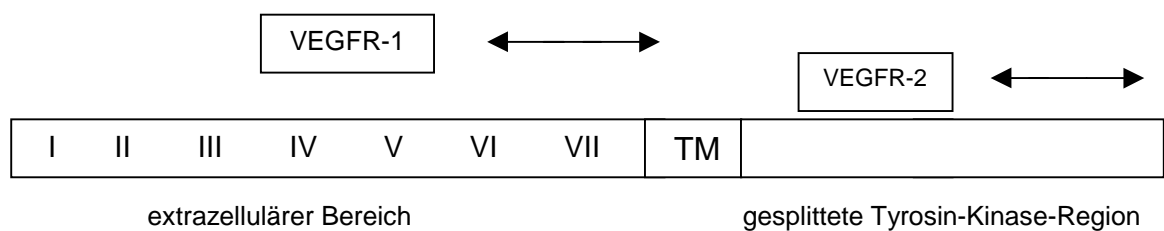
A: CAG GGA TCC TGA AAT TAC T

B: CTG TCG ACG TTT GAG AAC CTC AC

Annealingtemperatur: 62°C

Produktgröße: 460 bp

Transmembrane VEGF-Rezeptoren:



sVEGFR-1 (Spleißvariante):

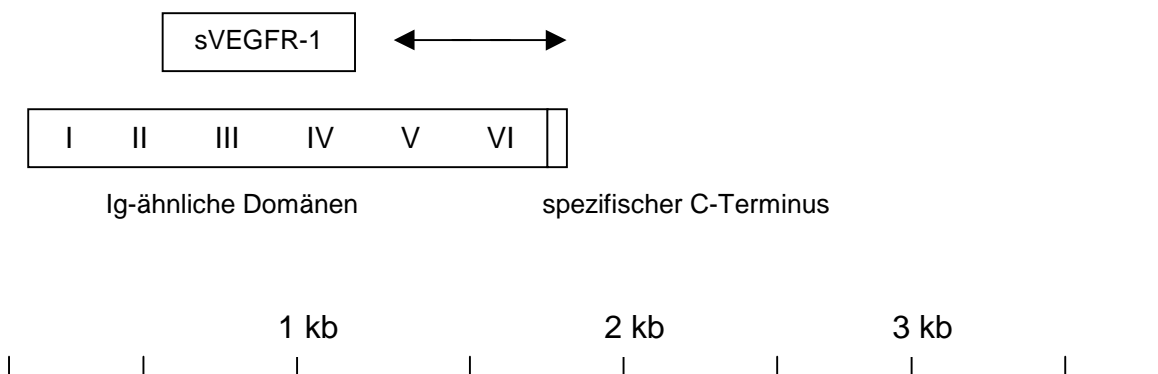


Abb. 2.2: Übersicht der verwendeten RT-PCR-Primerpaare. Die Pfeile demonstrieren die Lage der Primerpaare.

Um nach der reversen Transkription (RT) die Expression eines Gens mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zu untersuchen, wurden 1 µl der gewonnenen cDNA in insgesamt 20 µl Reaktionsansatz (1 x Reaktionspuffer, 2,5 mM MgCl₂, je 1 mM dNTP, je 0,5 pM "sense und antisense"-Primer (Primer A und B), 2 U Taq-DNA-Polymerase (Promega, Madison, USA)) eingesetzt. In einem Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen) wurden die spezifischen Schritte der PCR 35 x ausgeführt (60 sec Denaturierung bei 95°C, 120 sec Annealing bei einer Primer-spezifischen Temperatur und 3 min Elongation) und mit einer terminalen Elongation von 10 min beendet.

2.4.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von cDNA-Fragmenten

Zur Identifizierung und Detektion von cDNA-Fragmenten (PCR-Produkte oder Restriktionsansätze) wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem DNA-Standard (DNA VI-Standard, Boehringer Mannheim) verglichen. Dazu wurde der Ansatz nach Vermengen mit Auftragspuffer (30 % Glycerol, 100 mM EDTA, je 1 Spatelspitze Bromphenolblau und Xylenblau) auf ein 0,8 bis 1,3 % Agarose/1 x TBE (12,1 g Tris, 6,18 g Borsäure, 0,74 g EDTA, pH 8,3)-Gel geladen und in 1 x TBE-Puffer eine Spannung angelegt. Durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid im Laufpuffer und im Gel wird mittels UV-Licht die cDNA sichtbar und mit Hilfe einer Video-Kamera dokumentiert.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Bestimmung der sFLT-1-Konzentration im Medienüberstand mittels ELISA

Zur Bestimmung der sVEGFR-1-Konzentration in Zellkulturüberständen und komplexen Realproben wurde ein Sandwich-ELISA verwendet (Hornig et al., 1999).

Da der lösliche Rezeptor komplexiert mit rezeptorbindenden Proteinen, beispielsweise VEGF, oder frei und unkomplexiert vorliegen kann, wurden zwei verschiedene Testsysteme eingesetzt um zwischen diesen beiden Formen zu unterscheiden. Zur Quantifizierung von komplexiertem sVEGFR-1 wurde ein Antikörper zum Fangen eingesetzt, der Komplexe erkennt. Zur Bestimmung des freien sVEGFR-1 diente ein

sVEGFR-1-bindendes Protein als Fänger-Molekül. Zur weiteren Detektion wurde in beiden Formaten ein klassischer Sandwich-Aufbau durchgeführt. Die Messung einer Probe wurde jeweils in Duplikaten in 96-Loch-Platten (Maxisorb, NUNC, Roskilde, Dänemark) durchgeführt.

Quantifizierung des komplexierten sVEGFR-1:

Die Platten wurden mit 100 µl/Loch monoklonalem anti-VEGFR-1-Antikörper FLT-19 (1:100 verdünnt in PBS, pH 7,4) über Nacht bei 4°C beschichtet und anschließend mit 200 µl/Loch Waschpuffer (50 mM Tris, 0,2 % Tween-20, pH 8,0) zweimal gewaschen. Es folgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen für 1 Stunde mit 200 µl/Loch Assaypuffer (1 % FCS in PBS, pH 7,4). Alle weiteren Inkubationsschritte wurden nun wie die Blockierung bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler (Stuart Scientific) bei 150 rpm durchgeführt und durch drei Waschschrte unterbrochen. Das Volumen der eingesetzten Lösungen war 100 µl/Loch. Die Proben wurden, wenn notwendig in Assaypuffer verdünnt, ansonsten unverdünnt, neben einem sVEGFR-1-Standard eingesetzt und inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des polyklonalen Detektionsantikörpers (791, Protein A gereinigt) mit 1 µg/ml IgG in Assaypuffer und eine weitere Inkubation des biotinylierten anti-Kaninchen-IgG (Dianova, Hamburg), der 1:40 000 in Assaypuffer verdünnt wurde. In einem weiteren Schritt wurde für 30 min Streptavidin-Enzym-Konjugat (Endogen, Woburn, MA, USA) 1:20 000 in Assaypuffer verwendet. Nach Zugabe von TMB-Substrat (Tetra-Methyl-Benzidin, Boehringer, Mannheim; 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5 mit 0,1 mg/ml TMB und 0,004 % H₂O₂) und Abstoppen der Reaktion mit 50 µl/Loch 1 M H₂SO₄ wurde die Absorption bei 450 nm und 650 nm (als Referenz) gemessen.

Quantifizierung des frei und unkomplexiert vorliegenden sVEGFR-1:

Zur Vorbereitung der 96-Loch-Platte wurden die Löcher mit 100 µl/Loch rekombinantem VEGF₁₆₅ (2,5 µg/ml mit Zugabe von 1 µg/ml Heparin) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die folgenden Arbeitsschritte sind bei der Quantifizierung des komplexierten sVEGFR-1 beschrieben.

Allerdings wurde der Detektionsantikörper gegen den monoklonalen Antikörper 352 getauscht, der 1:1 000 in Assaypuffer eingesetzt wurde. Anstatt des biotinylierten anti-Kaninchen Antikörpers wurde ein biotinylierter anti-Maus-IgG (1:20 000 in Assaypuffer)

verwendet. Anschließend wurde mit einer Inkubation mit Streptavidin-Enzym-Konjugat fortgefahren.

2.5.2 Iodierung rekombinanter Proteine

Die radioaktive Markierung des Wachstumsfaktors VEGF wurde der Chloramin T-Methode durchgeführt, die an Hunter und Greenwood (1962) angelehnt war.

5 µg rekombinantes VEGF₁₆₅ aus dem Baculovirus-Expression-System in 100 µl 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 wurde mit 250 µCi Iodine-¹²⁵ (NaI in NaOH, Amersham, Life Science, Braunschweig) versetzt. Die Reaktion wurde mit Zugabe von 20 µl 1 mg/ml Chloramin T initiiert und nach 60 bis 90 sec mit 20 µl 1 mg/ml Natrium-Metabisulfit abgestoppt. Um die überschüssige Radioaktivität abzutrennen, wurde der Reaktionsansatz einer Gelfiltration mittels Sephadex G-25 in einer PD-10 Säule (Amersham, Life Science, Braunschweig) unterzogen. Die spezifische Aktivität der mit PBS mit 1 mg/ml BSA eluierten Fraktionen wurde im Gamma-Zähler (Beckmann, München) bestimmt. Das entstandene ¹²⁵I-VEGF wurde bei -20°C gelagert und in den folgenden zwei Monaten eingesetzt.

2.5.3 Bindungsexperimente mit radioaktiv-markierten rekombinanten Proteinen

Zur Untersuchung der spezifischen Bindung von VEGF an Rezeptoren auf der Endothelzelloberfläche wurden Bindungsstudien durchgeführt, bei denen der Anteil der gebundenen radioaktiv-markierten Wachstumsfaktoren bestimmt wurde.

Die zu untersuchenden Endothelzellen wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und mindestens 24 Stunden bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert und/oder stimuliert. Die Bindungsstudie wurde in eiskaltem Bindepuffer durchgeführt, der aus DMEM-Medium mit 20 mM Hepes und 1 mg/ml BSA hergestellt wurde. Nach zwei-maligem Waschen wurden die Zellen mit Bindepuffer überschichtet, dem das radioaktiv-markierte VEGF mit einer Endkonzentration von 1 ng/ml zugesetzt wurde. Nach 3 bis 5 Stunden Inkubation auf Eis unter schwenken wurden die Zellen erneut gewaschen und mit Lysispuffer (0,3 M NaOH, 0,1 % SDS) bedeckt. Nach 10 min wurden die Proben im Gamma-Zähler (Beckmann, München) vermessen und ausgewertet.

Kompetitionsversuche, bei denen ein unmarkiertes Protein in hohem Überschuß zugesetzt wurde, dienten dazu, den Anteil der spezifischen Bindungen zu ermitteln. Es wurden PIGF-2 in 1000-fachem Überschuß und VEGF₁₆₅ in 250-fachem Überschuß verwendet und gleichzeitig mit dem jodiertem Material auf die Zellen pipettiert.

2.5.4 Immunpräzipitation

Zum Nachweis der Proteinexpression in Zellkulturen wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers eine Immunpräzipitation durchgeführt.

Die adhärenenten Zellen wurden mit eiskaltem PBS gründlich gewaschen und anschließend mit eiskaltem Lysispuffer Staph A (10 mM NaPhosphatpuffer, 1 % Triton X-100, 100 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 mM Deoxycholate, 1 mM Na₃VO₄) bedeckt. Die entstandenen Zellysate wurden mit Hilfe des BCA-Assays auf ihre Proteinkonzentrationen untersucht, und anschließend wurde eine einheitliche Proteinkonzentration durch Verdünnen mit Staph A-Puffer eingestellt. 500 µl des Zellysates wurden mit dem monoklonalen Antikörper 3G2 gegen VEGFR-2 (Verdünnung 1:100 bis 1:400) und 50 µl/ml eines murinen IgG-Antikörpers, der an Agarose gekoppelt ist (mouse IgG agarose beads, SIGMA) vermengt und 3,5 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die an die Antikörper gebundenen Proteine wurden abzentrifugiert, in Probenpuffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt.

2.5.5 SDS-PAGE

Zur analytischen Trennung von Proteinen wurde nach der Methode von Laemmli eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in vertikalen Gelkammern (Mini-Protean II von Biorad, München) durchgeführt. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde gewährleistet, daß eine Auftrennung nach der unterschiedlichen Molekularmasse erfolgte.

Die proteinhaltigen Proben wurden in 4 x SDS-Probenpuffer (1 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 4 ml Wasser, 0,8 ml 30 % (v/v) Glycerin, 1,6 ml 10 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau) aufgenommen, der β-Mercaptoethanol zur Denaturierung enthielt, und 10 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Auftrag auf das Gel (Trenngel 5 %ig: 2,5 ml

Acrylamid/Bisacrylamid 30 % (Roth, Karlsruhe), 3,8 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS), 3,6 ml Wasser, 70 µl 10 % APS, 7 µl TEMED; Sammelgel 4 %-ig: 0,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30 % (Roth, Karlsruhe), 1,25 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % SDS), 3,0 ml Wasser, 50 µl 10 % APS, 7 µl Temed) wurde bis zum Eindringen in das Sammelgel bei 60 V und danach für 60 bis 90 min bei 180 V elektrophoretisiert. Dazu diente der Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS). Zur Standardisierung wurde der Größenmarker Broad Range (BioRad, München) von 7 kDa bis 200 kDa benutzt.

2.5.6 Western Blotting

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Trans-Blot[®] SemiDry Transfer Cell (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers auf eine Immobilon[™] PVDF-Membran (Millipore, Esensorn) transferiert. Die hydrophobe Membran wurde zuerst mit Methanol aktiviert, dann zusammen mit dem Proteingel 10 min in Transferpuffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol) äquilibriert. Das Blotting erfolgte in Transferpuffer für 1 Stunde bei 45 mA pro Minigel.

Zur Identifikation der Proteine durch spezifische Antikörper wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung TBST (50 mM Tris-Base, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,0 + 0,05 % Tween-20) mit 3 % BSA abgesättigt. Anschließend folgte die Inkubation des primären monoklonalen Antikörpers in TBST mit 3 % BSA für 1 Stunde. Die Membran wurde danach 3 x für jeweils 5 min in TBST gewaschen und mit dem sekundären Ziege anti-Maus Antikörper (Promega, Madison, USA), der mit einer Peroxidase gekoppelt ist, für 1 Stunde inkubiert. Die Waschschriffe erfolgen wie zuvor beschrieben. Zur Detektion der Proteine wurde das ECL-System (Amersham, Life Science, Braunschweig) verwendet. Die frisch gewaschene Membran wurde nach einem kurzen Wasserschwenk in den frisch zusammenpipetierten ECL-Lösungen 1 und 2 (gleiche Volumina) für 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Proteinbanden auf Röntgenfilmen (X-Omat, Kodak, Stuttgart) sichtbar, die in der Dunkelkammer für 5 sec bis 5 min exponiert wurden.

2.5.7 BCA-Test

Um zu gewährleisten, daß einheitliche Proteinmengen auf eine SDS-PAGE geladen wurden, wurde ein BCA-Test mit den Zellysaten durchgeführt.

50 µl der Proteinprobe wurden mit 950 µl fertigen BCA-Reagenzes (frisch angestetzt, Reagenz B 1:50 in Reagenz A verdünnt; Pierce, Rockford, USA) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 65°C wurde in einem Photometer (Milton Roy, Ivyland, USA, Spectronic Genesys 2) bei 562 nm die Extinktion bestimmt. Der Proteingehalt wurde aus einer Kallibrierreihe ermittelt, die in einem Parallelansatz mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 200 µg/ml erstellt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Die Kultur humaner Endothelzellen

3.1.1 Die Primärzellkultur humaner Endothelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich die makrovaskulären, humanen Zellen aus der Nabelschnurvene (HUVE-Zellen) verwendet, die sich leicht aus der Nabelschnur isolieren lassen. Im Vergleich wurden mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Vorhaut (HDME-Zellen) und aus dem Myometrium (UtMVE-Zellen) untersucht. Diese primären Zellen wurden von Passage 0 bis zu Passage 12 in den Experimenten eingesetzt. Bei höheren Passagen wurde die vorher einheitliche Morphologie der Zellen zunehmend heterogener, so daß diese Zellen nicht mehr eingesetzt wurden.

Ein spezifischer Endothelzellmarker ist der von-Willebrand-Faktor (Wagner et al., 1982). Nach Durchführung einer immunhistologischen Färbung mit einem anti-von-Willebrand-Faktor-Antikörper konnte im Fluoreszenzmikroskop die charakteristische Akkumulation des Proteins in Weibel-Körperchen sichtbar gemacht werden (Abb. 3.1). Dieses Muster konnte in 70 bis 80 % der kultivierten und untersuchten Endothelzellen höherer Passage (8-10) gezeigt werden.

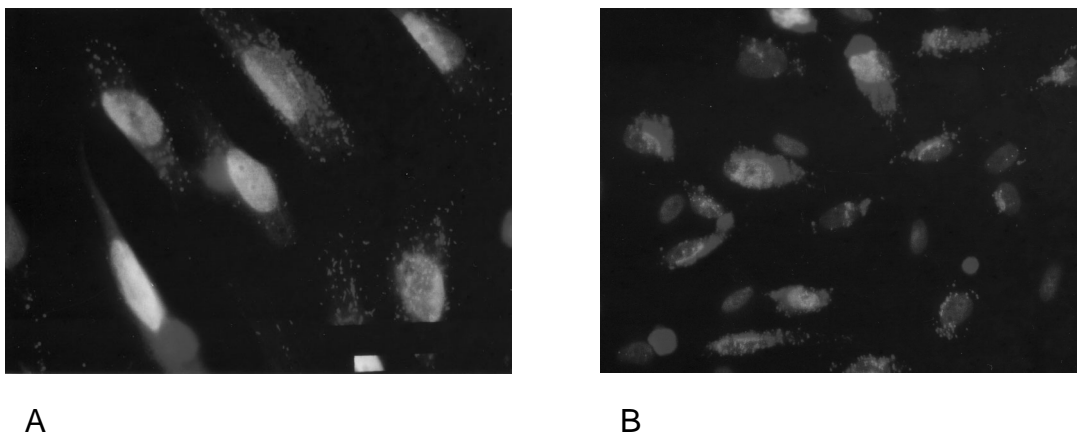


Abb. 3.1 Immunhistologische Anfärbung von HUVE-Zellen in Passage 6 mit dem endothelzell-spezifischen Marker von-Willebrand-Faktor (rot). Als Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Vergrößerung (A) 100-fach, (B) 40-fach.

3.1.2 Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Faktoren auf die Mitogenität der Endothelzellen

Eine Proliferation der Endothelzellen wird in physiologischen und pathologischen Situationen durch einen angiogenen Stimulus angeregt. Um die Faktoren zu identifizieren, auf die Endothelzellen *in vitro* eine Reaktion zeigen, wurden Mitogenitätstests durchgeführt. Diese Tests dienen auch zur Verifizierung der Endothelzellen, da nur diese auf einen endothelzell-spezifischen Wachstumsfaktor wie VEGF reagieren. Dazu wurden Proliferationstests, die auf der Zellzahlbestimmung basieren, und DNA-Synthese-Tests, die die Aufnahme radioaktiv-markierten Thymidins in die Zelle ermitteln, verwendet. Im Vergleich zeigten beide Test-Formate vergleichbare Ergebnisse: Nach Stimulation der Zellen mit bFGF zeigte sich eine Vervierfachung der Zellzahl nach fünf Tagen Testdauer und eine 3-fache Erhöhung der DNA-Syntheserate nach 24 Stunden Stimulation (Abb. 3.2). Beide Test-Formate ließen sich für Experimente zur Untersuchung der Endothelzell-Mitogenität einsetzen.

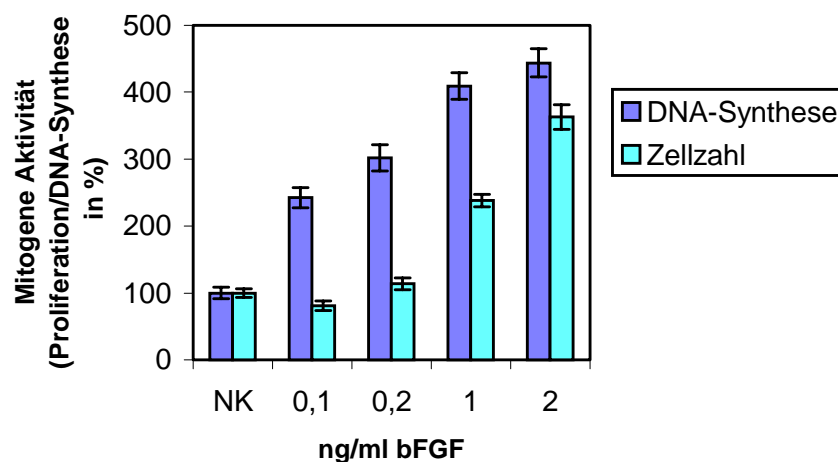


Abb. 3.2: Mitogenitätstests mit HUVE-Zellen. HUVE-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen bFGF stimuliert und im Proliferationstest nach fünf Tagen die Zellzahl bzw. im DNA-Synthese-Test nach 24 Stunden Inkubation die [methyl-³H]-Thymidin-Einbaurate bestimmt. Beide Testformate wurden in Triplikaten durchgeführt und die Werte der Negativkontrolle ohne bFGF (NK) als 100 % gesetzt. Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

Der Effekt auf die Zellen war ab 0,1 µg/ml bFGF erkennbar und war dosis-abhängig. Der maximale Effekt ließ sich bei 2 µg/ml beobachten und war saturierbar.

Diese Untersuchung zeigte, daß die Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen stimulierbar waren, d.h. sie konnten durch Zugabe exogener Faktoren zur Proliferation angeregt werden. Ähnliche Experimente mit mikrovaskulären Zellen, HDME- und UtMVE-Zellen, zeigten vergleichbare Ergebnisse. Auch diese Zelltypen zeigten eine positive Antwort auf bFGF in Proliferations- oder DNA-Synthese-Tests, indem sie auf exogene Faktoren reagierten.

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Zellen auch auf das endothelzell-spezifische Mitogen VEGF reagieren, wurden weitere Mitogenitätstest mit VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ und dem verwandten Faktor PIGF-2 durchgeführt. Diese rekombinanten Proteine wurden im Baculo-Expressions-System in der eigenen Arbeitsgruppe hergestellt und aufgereinigt. Die HUVE-Zellen zeigten eine positive Antwort auf die Wachstumsfaktoren, wobei charakteristischer Weise der maximale Effekt mit 10 ng/ml VEGF₁₆₅ etwa der halben maximalen Aktivität des bFGFs (2 ng/ml) entsprach. Eine maximale Stimulation mit VEGF₁₂₁ und mit PIGF-2 zeigte einen mitogenen Effekt, der allerdings unterhalb der Aktivität von VEGF₁₆₅ lag. Da eine Zellteilung durch das endothelzell-spezifische VEGF induziert wurde, wurde die Expression eines funktionsfähigen VEGFR-2 angenommen. Interessant ist, daß PIGF-2, obwohl es nur an VEGFR-1 bindet, einen geringen mitogenen Effekt auf die Endothelzellen ausübt (Tab. 3.1).

	HUVE-Zellen	HDME-Zellen	UtMVE-Zellen
bFGF	↑ 3,8x	↑ 2,0x	↑ 1,6x
VEGF ₁₆₅	↑ 2,1x	↑ 1,7x	↑ 2,4x
VEGF ₁₂₁	↑ 1,9x	↑ 1,7x	●
PIGF-2	↑ 2,0x	●	↑ 1,7x

Tab. 3.1: Effekte von VEGF-Rezeptor-bindenden Wachstumsfaktoren und bFGF auf die DNA-Synthese verschiedener Endothelzellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Zytokinen behandelt, und nach Zugabe von [methyl-³H]-Thymidin wurde die Einbaurate des radioaktiven Thymidins ermittelt (in Triplikaten).

↑ Anstieg der DNA-Synthese; ↓ Inhibition der DNA-Synthese; ● kein Effekt.

Die HDME-Zellen zeigten ein vergleichbares Stimulationsmuster wie die HUVE-Zellen auf die getesteten Mitogene (Abb.3.3). Die mikrovaskulären Zellen aus dem Myometri-um (UtMVE-Zellen) dagegen reagierten anders auf bFGF und VEGF₁₆₅: Die maximale Stimulation wurde mit 10ng/ml VEGF₁₆₅ erreicht und der mitogene Effekt von 10 ng/ml bFGF erreichte etwa die Hälfte der VEGF₁₆₅ Stimulation (Abb.3.4).

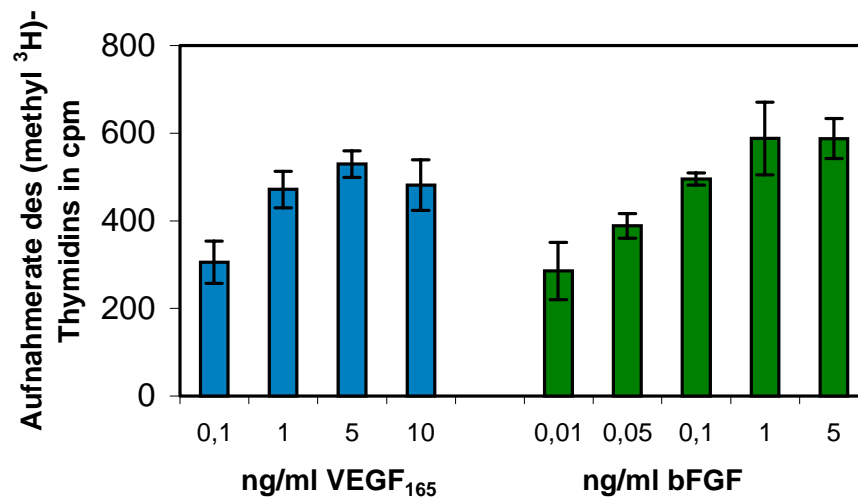


Abb. 3.3: Effekt von VEGF₁₆₅ und bFGF auf die DNA-Synthese von HDME-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Zytokinen behandelt und nach Zugabe von [methyl-³H]-Thymidin wurde die Einbaurate des radioaktiven Thymidins ermittelt (in Triplikaten). Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

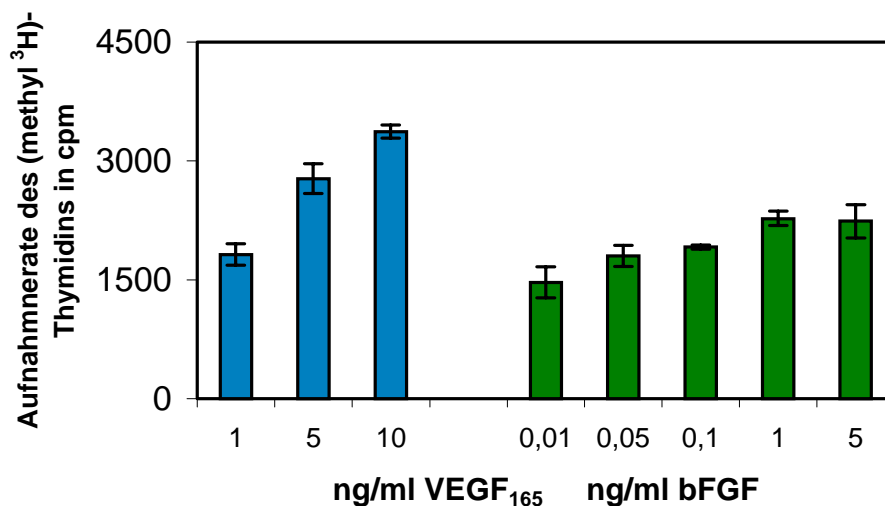


Abb. 3.4: Effekt von VEGF₁₆₅ und bFGF auf die DNA-Synthese von UtMVE-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Zytokinen behandelt und nach Zugabe von [methyl-³H]-Thymidin wurde die Einbaurate des radioaktiven Thymidins ermittelt (in Triplikaten). Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

3.1.3 Stimulation der primären Endothelzellen mit Zytokinen

Um weitere Faktoren zu finden, die einen Einfluß auf die Proliferation bzw. die DNA-Synthese nehmen, wurden neben unterschiedlichen Medienzusammensetzungen auch verschiedene Zytokine eingesetzt und analysiert. Es wurden Mitogentests durchgeführt, wobei die Faktoren einzeln und in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellen gegeben wurden.

Der saure Fibroblast Growth Factor (aFGF), der neben dem basischen Fibroblast Growth Factor als angiogener Faktor beschrieben wird, wurde auf einen Einfluß auf Endothelzellen untersucht. Die inflammatorischen Zytokine wie beispielsweise Interleukin-1 alpha (Il-1 alpha) und Interleukin-1 beta (Il-1 beta) wurden ebenso wie Interleukin-6 (Il-6) verwendet, um eine eventuelle mitogene Aktivität der Endothelzellen zu beobachten.

Inhibin wurde ebenfalls untersucht, da es als ein ausschließlich von Granulosazellen gebildetes Protein eine Rolle im Corpus luteum spielen könnte. Die Granulosazellen synthetisieren die Steroidhormone Progesteron und Östradiol. Die von Herrn Prof. Neulen aus Aachen zur Verfügung gestellten Granulosazellen wurden in Vorversuchen mit den Peptidhormonen luteinisierendes Hormon (LH) und Choriongonadotropin (hCG) behandelt, diese beeinflussten die VEGF- und Progesteronsynthese dieser Zellen.

Zur leichteren Übersicht wurden die Faktoren in Gruppen eingeteilt:

- (1) die VEGF-Rezeptoren-bindenden Faktoren und zusätzlich bFGF (bFGF, VEGF und PlGF-2);
- (2) die Zytokine und Faktoren (Interleukine und Inhibin) sowie
- (3) die Hormone (Progesteron, Östradiol, LH und hCG).

Die humanen Endothelzellen zeigten eine deutliche Zunahme der DNA-Synthese nach Zugabe von Wachstumsmedium, das im Vergleich zu Mangelmedium die doppelte Serumkonzentration sowie verschiedene Wachstumsfaktoren enthielt (Tab.3.2). Zur Negativkontrolle diente Mangelmedium. Dies ergänzt die Ergebnisse mit VEGF₁₆₅ und bFGF (Tab. 3.1), denn das Wachstumsmedium enthält unter anderem diese Wachstumsfaktoren. Die HUVE-Zellen erhöhten ihre DNA-Synthese neben den VEGF-Rezeptor-bindenden Wachstumsfaktoren auch durch aFGF (1 ng/ml). Die HDME-Zellen steigerten die Einbaurate des radioaktiven Thymidins nach Inkubation mit

aFGF (1 ng/ml) und Inhibin (10 ng/ml). Die UtMVE-Zellen erhöhten nicht nur ihre DNA-Synthese nach Stimulation mit aFGF (1 ng/ml), sie zeigten nach Inkubation mit Il-1 alpha (5 ng/ml) und Il-1 beta (5 ng/ml) eine Reduktion des Thymidineinbaus (Tab. 3.2).

	HUVE-Zellen	HDME-Zellen	UtMVE-Zellen
Mangelmedium	●	●	●
Wachstumsmedium	↑2,8x	↑1,6x	↑2,5x
aFGF	↑2,7x	↑1,8x	↑2,5x
Il-1 alpha	●	●	↓0,6x
Il-1 beta	●	●	↓0,6x
Il-6	●	●	●
Inhibin	●	↑1,8x	●

Tab. 3.2: Effekte von verschiedenen Medien, Zytokinen und Inhibin auf die DNA-Synthese verschiedener Endothelzellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Zytokinen behandelt, und nach Zugabe von [methyl-³H]-Thymidin wurde die Einbaurate des radioaktiven Thymidins ermittelt (in Triplikaten).

↑ Anstieg der DNA-Synthese; ↓ Inhibition der DNA-Synthese; ● kein Effekt.

Die Steroidhormone übten keinen Einfluß auf die DNA-Synthese der humanen Endothelzellen aus (Tab.3.3). Weder die HUVE-Zellen, die HDME-Zellen noch die UtMVE-Zellen zeigten eine veränderte Einbaurate des radioaktiv-markierten Thymidins nach Stimulation mit Progesteron oder Östradiol.

	HUVE-Zellen	HDME-Zellen	UtMVE-Zellen
Progesteron	●	●	●
Östradiol	●	●	●
hCG	●	●	●
LH	●	●	↑1,7x

Tab. 3.3: Effekte von Hormonen auf die DNA-Synthese verschiedener Endothelzellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Zytokinen behandelt, und nach Zugabe von [methyl-³H]-Thymidin wurde die Einbaurate des radioaktiven Thymidins ermittelt (in Triplikaten). LH (luteinisierendes Hormon), hCG (humanes Choriongonadotropin).

↑ Anstieg der DNA-Synthese; ↓ Inhibition der DNA-Synthese; ● kein Effekt.

Das Peptidhormon hCG beeinflusste ebenfalls die DNA-Synthese der Endothelzellen nicht. Ein weiteres Peptidhormon, LH (0,01 U/ml), allerdings steigerte in UtMVE-Zellen die Tymidineinbaurate, nicht aber in HUVE-Zellen oder in HDME-Zellen (Tab. 3.3).

Die humanen Endothelzellen waren durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone stimulierbar, d.h. sie veränderten oder steigerten ihre Zellteilungsrate oder den Einbau radioaktiven Thymidins. Am deutlichsten ist die Steigerung bei den HUVE-Zellen und den HDME-Zellen durch Stimulation mit bFGF zu sehen. Bei den UtMVE-Zellen ist neben einer Erhöhung durch VEGF₁₆₅ oder Wachstumsmedium auch eine Reduzierung unter Einfluß der Il-1 alpha und Il-1 beta zu beobachten.

3.2 Expression der VEGF-Rezeptoren in humanen primären Endothelzellen

Wie in der Einleitung beschrieben, tragen humane Endothelzellen verschiedene Bindungsstellen für den Angiogenese induzierenden Wachstumsfaktor VEGF auf ihrer Oberfläche. Diese zum Teil hochaffinen Bindungsstellen wurden während der letzten Jahre identifiziert und genauer charakterisiert. Die VEGF-bindenden Rezeptor Tyrosin-Kinasen wurden zunächst mit Flt-1 (Shibuya et al., 1991; de Vries et al., 1992) und KDR (Terman et al., 1991) bezeichnet, werden nun als VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR) beschrieben. Im Gegensatz zu VEGFR-2, der ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird, ist VEGFR-1 auch auf Monozyten und dendritischen Zellen nachgewiesen worden (Clauss, 1998; Gabrilovich et al., 1996).

Die Untersuchung der Expression der Rezeptor Tyrosin-Kinasen diente zur Bestätigung, daß trotz Kultivierung der primären Endothelzellen die funktionellen Rezeptoren nachzuweisen waren.

3.2.1 Untersuchung der Expression der VEGFR-1 und VEGFR-2 mit RT-PCR in primären Endothelzellen

Zum qualitativen Nachweis der Genexpression von *flt-1* und *KDR* in den humanen primären Endothelzellen wurde die Gesamt-RNA der kultivierten Zellen isoliert. Es

folgte eine Reverse Transkription (RT) und eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe von ausgewählten Primerpaaren für die VEGF-Rezeptorgene.

Zum Nachweis des Transkriptes für das lösliche VEGFR-1 wurde ein Primerpaare ausgewählt, dessen Primer eine Sequenz begrenzen, die aufgrund der spezifischen Struktur aus dem Intron 6 des *flt-1*-Gens einen Nachweis der Transkripte für das sVEGFR-1-Protein erlauben.

Zur Kontrolle von Verunreinigungen der Gesamt-RNA durch genomische DNA wurde eine PCR mit der entsprechenden Menge Gesamt-RNA durchgeführt. Wenn keine Produktbildung ohne Reverse Transkription stattfand, konnte von störenden Verunreinigungen abgesehen werden.

Die Primerpaare ergaben für die transmembrane *flt-1*-Variante ein erwartetes PCR-Produkt mit einer Größe von 460 bp, für die lösliche *flt-1*-Variante von 500 bp und für *KDR* von 410 bp.

Die PCR-Produkte wurden auf ihre Spezifität durch einen Verdau mit Restriktionsenzymen untersucht. Anhand der Sequenz wurde eine Restriktionsschnittstelle gewählt, die das PCR-Produkt in zwei unterschiedlich große Fragmente teilte und somit Auskunft über die Spezifität gab.

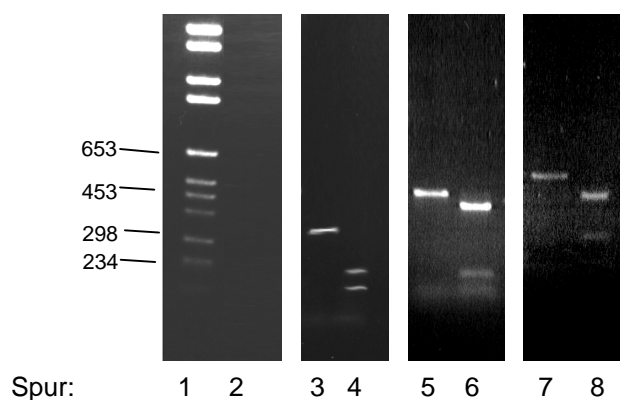


Abb. 3.5: Gelelektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte für die transmembrane und die lösliche Variante des *flt-1* und *KDR* in HUVE-Zellen. Es wurde eine RT-PCR mit cDNA oder Gesamt-RNA aus HUVE-Zellen mit Primerpaaren für die transmembrane und die lösliche Variante des *flt-1* und *KDR* durchgeführt sowie die anschließende Kontrollspaltung.

Spur 1: Größen-Standard (Angaben in bp); Spur 2: *flt-1*-Primer (transmembrane Variante) und Gesamt-RNA; Spur 3: *flt-1*-Primer (transmembrane Variante) und cDNA; Spur 4: Kontrollspaltung der *flt-1*-Primer (transmembrane Variante) und cDNA mit *Ava* II; Spur 5: *flt-1*-Primer (lösliche Variante) und cDNA; Spur 6: Kontrollspaltung der *flt-1*-Primer (lösliche Variante) und cDNA mit *Hind* III; Spur 7: *KDR*-Primer und cDNA; Spur 8: Kontrollspaltung der *KDR*-Primer und cDNA mit *Eco* RV.

Das RT-PCR-Produkt für die transmembrane *flt-1*-Variante wurde durch einen Verdau mit Ava II in zwei Fragmente mit der Größe von 320 bp und 140 bp geteilt. Das lösliche *flt-1*-Produkt konnte nach einer Hind III-Behandlung in zwei Fragmente von 410 bp und 90 bp verdaut werden. Nach einem Eco RV-Verdau wurden zwei Fragmente des *KDR*-Produktes mit 180 bp und 130 bp in der Gelelektrophorese sichtbar.

Die primären Endothelzellen wurden auf die Genexpression der VEGF-Rezeptoren untersucht, nachdem sie in Wachstumsmedium bis zur Konfluenz kultiviert wurden.

Die Genexpression des transmembranen und des löslichen *flt-1* und *KDR* konnte in kultivierten HUVE-Zellen mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden (Abb. 3.5). Die Kontroll-PCR, in der Gesamt-RNA eingesetzt wurde, ergab kein PCR-Produkt; die Gesamt-RNA war also nicht mit detektierbaren Mengen an genomischer DNA verunreinigt.

Auch in den mikrovaskulären HDME-Zellen wurden mit der RT-PCR Transkripte der drei Rezeptoren für VEGF gefunden (Abb 3.6). Das Kontrollexperiment mit der Gesamt-RNA, die nicht in cDNA umgeschrieben wurde, zeigte kein Signal.

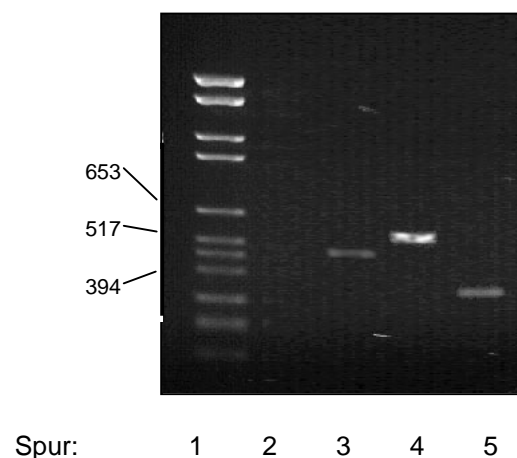


Abb. 3.6: Gelelektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte für die transmembrane und die lösliche Variante des *flt-1* und *KDR* in HDME-Zellen. Es wurde eine RT-PCR mit cDNA oder Gesamt-RNA aus HDME-Zellen mit Primerpaaren für die transmembrane und die lösliche Variante des *flt-1* und *KDR* durchgeführt.

Spur 1: Größen-Standard (Angaben in bp); Spur 2: *flt-1*-Primer (transmembrane Variante) und Gesamt-RNA; Spur 3: *flt-1*-Primer (transmembrane Variante) und cDNA; Spur 4: *flt-1*-Primer (lösliche Variante) und cDNA; Spur 5: *KDR*-Primer und cDNA.

Die Analyse der UtMVE-Zellen ergab ebenfalls RT-PCR-Produkte für die Transkripte der VEGF-Rezeptoren (Abb. 3.7). Das Ergebniss der Kontrolluntersuchung mit der Gesamt-RNA war negativ.

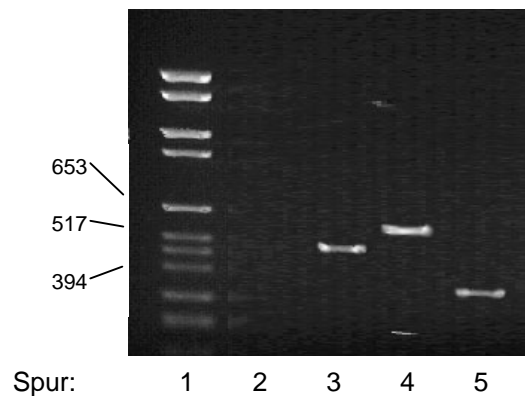


Abb. 3.7: Gelelektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte für die transmembrane und die lösliche Variante des *flt-1* und *KDR* in UtMVE-Zellen. Es wurde eine RT-PCR mit cDNA oder Gesamt-RNA aus UtMVE-Zellen mit Primerpaaren für die transmembrane und die lösliche Variante des *flt-1* und *KDR* durchgeführt.

Spur 1: Größen-Standard (Angaben in bp); Spur 2: *flt-1*-Primer (transmembrane Variante) und Gesamt-RNA; Spur 3: *flt-1*-Primer (transmembrane Variante) und cDNA; Spur 4: *flt-1*-Primer (lösliche Variante) und cDNA; Spur 5: *KDR*-Primer und cDNA.

3.2.2 Untersuchung der VEGFR-2-Proteinexpression in primären Endothelzellen

Zum Nachweis des VEGFR-2-Proteins in den primären Endothelzellen wurde mit Hilfe eines monoklonalen anti-VEGFR-2 Antikörpers eine Immunpräzipitation der Endothelzell-Lysate durchgeführt. Das entstandene Präzipitat aus Rezeptorprotein und Antikörper wurde in der Western Blot Analyse mit einem polyklonalen gegen VEGFR-2 gerichteten Antikörper untersucht und das Protein nachgewiesen.

Die Endothelzellen wurden in Wachstumsmedium kultiviert, kurz vor Erreichen der Konfluenz lysiert und in der Immunpräzipitation auf die VEGFR-2-Proteinexpression untersucht.

In dem Lysat der HUVE-Zellen konnte die charakteristische Form der VEGFR-2-Doppelbande bei etwa 230 kDa detektiert und somit die Proteinexpression des VEGFR-2 nachgewiesen werden (Abb. 3.8 A). Dabei ist die obere Bande stets deutlicher ausgeprägt als die untere. In den Lysaten der HDME- und der UtMVE-Zellen

wurde eine Doppelbande kurz oberhalb des 200 kDa Standards detektiert. Die mikrovaskulären Zellen exprimieren also ebenfalls das VEGFR-2-Protein (Abb. 3.8 B, 3.8 C).

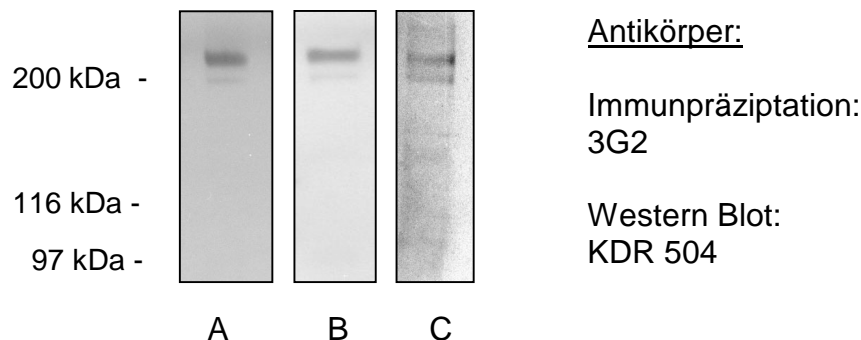


Abb. 3.8: Die Expression des VEGFR-2-Proteins in primären Endothelzellen in Kultur. Die Endothelzellen wurden bis zu 90 % Konfluenz kultiviert und das Zellysat wurde mit einem monoklonalen anti-VEGFR-2 Antikörper (3G2) immunpräzipitiert. Zuvor wurde das Lysat nach einem BCA-Test auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Nach SDS-Gelelektrophorese und Filtertransfer wurde VEGFR-2 mit einem polyklonalen Antikörper (KDR 504) im Western Blot nachgewiesen. (A) HUVE-Zellen, (B) HDME-Zellen, (C) UtMVE-Zellen.

3.2.3 Untersuchung der sVEGFR-1-Sekretion in primären Endothelzellen

Durch Einsatz eines immunologischen Tests (ELISA), der die Gesamtkonzentration des sVEGFR-1 ermittelt, konnten Endothelzell-Überstände auf sekretiertes sVEGFR-1-Protein untersucht werden. Durch den Nachweis dieser verkürzten Form des transmembranen VEGFR-1 konnten Rückschlüsse auf das VEGFR-1-Protein geschlossen werden, denn die beiden Varianten von VEGFR-1 scheinen im wesentlichen gleichmäßig exprimiert zu werden. Zur Durchführung einer Immunpräzipitation gegen VEGFR-1 war kein geeigneter Antikörper vorhanden.

Die Endothelzellen wurden nach Erreichen der Konfluenz weiterhin in Wachstumsmedium kultiviert und der Überstand nach 48 Stunden im ELISA analysiert.

Die HUVE-Zellen zeigten, wie auch die HDME- und UtMVE-Zellen, eine Akkumulation des sVEGFR-1 im Kulturüberstand (Tab. 3.4). Die HUVE-Zellen sekretierten die größte Menge des sVEGFR-1 nach 48 Stunden und die HDME-Zellen die geringste Menge.

Endothelzell-Typ	sVEGFR-1-Konzentration
HUVE-Zellen	8,4 +/- 4,1 ng/ml
UtMVE-Zellen	3,2 +/- 01,7 ng/ml
HDME-Zellen	1,8 +/- 1,1 ng/ml

Tab. 3.4: Übersicht der sVEGFR-1-Konzentration in konfluenten Kulturüberständen von Endothelzellen. Die sVEGFR-1-Konzentrationen wurden mit einem ELISA nach 48 Stunden Konditionierung des Wachstumsmediums ermittelt (Duplikate).

Dies entspricht den Werten von 3,5 ng/48 Stunden/ 1×10^5 HUVE-Zellen, von 1,6 ng/48 Stunden/ 1×10^5 UtMVE-Zellen und von 0,9 ng/48 Stunden/ 1×10^5 HDME-Zellen.

3.2.4 Bindungsstudien mit VEGF₁₆₅ und humanen primären Endothelzellen

In den folgenden Bindungsstudien wurde die Bindung von ^{125}I -VEGF₁₆₅ an humanen Endothelzellen untersucht. Die Untersuchungen wurden durchgeführt, um eventuelle Unterschiede im Bindungsverhalten der HUVE-, der HDME- und der UtMVE-Zellen zu identifizieren.

Die Gesamtbindung des ^{125}I -VEGF₁₆₅ lag bei gleicher Anzahl der Zellen bei den HUVE-Zellen um 25 % höher als bei den UtMVE-Zellen. Die HDME-Zellen zeigten eine 40% geringere Gesamtbindung von ^{125}I -VEGF₁₆₅ (Abb. 3.9).

Durch Zugabe von unmarkiertem VEGF₁₆₅ in 250-fachem Überschuß, das mit dem radioaktiv-markierten VEGF₁₆₅ um die spezifischen Bindungsstellen wie die von VEGFR-1, VEGFR-2 und Neuropilinen kompetitiert, konnte die Höhe der unspezifischen Bindung (z. B. Matrix) ermittelt werden. Es konnte jeweils eine spezifische Bindung, die durch die Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung ermittelt wurde, von ^{125}I -VEGF₁₆₅ an die Endothelzellen demonstriert werden. Die unspezifische Bindung lag bei den HUVE-Zellen bei 15 %, bei den UtMVE-Zellen bei 21 % und bei den HDME-Zellen bei 24% (Abb. 3.aa). Die spezifische Bindung bei den makrovaskulären HUVE-Zellen war deutlich höher als bei den mikrovaskulären Zellen.

Die Höhe der unspezifischen Bindungen von ^{125}I -VEGF₁₆₅ war bei allen Endothelzellen etwa gleich (Abb. 3.9).

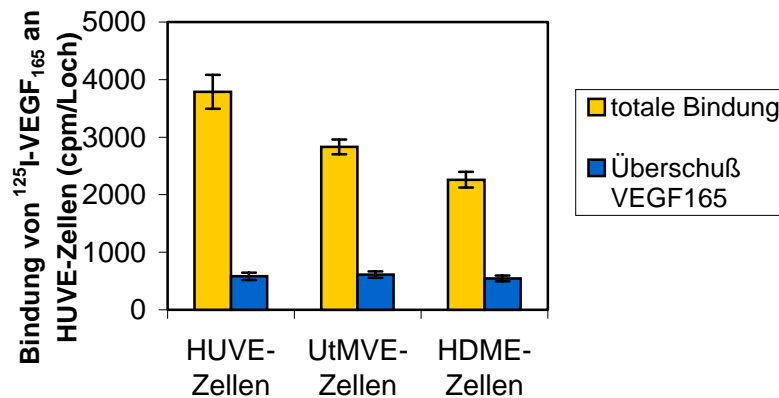


Abb. 3.9: Bindung von ^{125}I -VEGF₁₆₅ an verschiedene humane Endothelzellen. Eine gleiche Anzahl von Endothelzellen wurde für drei Stunden mit radioaktiv markiertem ^{125}I -VEGF₁₆₅ inkubiert und die Gesamtbindung des Liganden bestimmt (gelb). Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde das ^{125}I -VEGF₁₆₅ mit 250-fachem Überschuß an unmarkiertem VEGF₁₆₅ kompetitiert (blau). Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

3.3 Regulation der VEGF-Rezeptoren-1 und -2 in humanen Endothelzellen

Das Vorhandensein der Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Zielzelle ist die wichtige Voraussetzung zur Signalübermittlung durch den bindenden Liganden. Zur genauen Abstimmung und Weiterleitung der Signale muß sowohl die Expression des Liganden, sowie die Expression der entsprechenden Rezeptoren zeitlich und räumlich aufeinander abgestimmt sein. Beide Teile des Liganden/Rezeptorensystems unterliegen einer spezifischen Regulation, die im Falle des VEGF/VEGF-Rezeptorsystems besonders fein reguliert ist und auf verschiedenen Ebenen erfolgen kann. So führt bereits das Fehlen eines einzigen VEGF-Allels in Mausembryonen zu einem letalen Phänotyp (Ferrara et al., 1996).

Die humanen Endothelzellen, die in diesen Untersuchungen verwendet wurden, exprimieren die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 sowie das lösliche VEGFR-1-Protein (Kap. 3.2). Die Endothelzellen werden als ein *in vitro* Modell genutzt, um mögliche physiologische Mechanismen oder Moleküle zu identifizieren.

Durch Stimulation der Endothelzellen mit unterschiedlichen Zytokinen, Faktoren und Hormonen wurde nun der Einfluß dieser Faktoren, sowohl auf die Gen-, als auch auf die Proteinexpression der VEGF-Rezeptoren untersucht.

3.3.1 Die Regulation der VEGF-Rezeptoren

Zur Beantwortung der Frage, ob eine Regulation der VEGF-Rezeptoren in dem verwendeten *in vitro* System stattfindet, wurden die Endothelzellen in Wachstumsmedium und in Mangelmedium kultiviert. Das Wachstumsmedium enthält die doppelte Serumkonzentration und verschiedene Zytokine.

Die HUVE-Zellen wurden für 24 Stunden in Mangelmedium oder in Wachstumsmedium mit unterschiedlicher Wachstumsdichte (70 % Konfluenz und 100 % Konfluenz) kultiviert. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde in der Northern Blot Analyse auf die Genexpression von *flt-1* und *KDR* mit spezifischen Sonden und unter stringenten Bedingungen untersucht.

Als spezifische Sonde für *flt-1* diente ein humanes 1,05 kb cDNA-Fragment aus der extraplasmatischen Domäne. Die Sonde entsprach den Nukleotiden 172-1231 der publizierten humanen cDNA Sequenz (Shibuya et al., 1991; Barleon et al., 1994). Die *KDR*-Sonde bestand aus einem humanen 1,4 kb cDNA-Fragment aus der extraplasmatischen Domäne, das den Nukleotiden 360 – 1720 der Sequenz des *KDR*-Gens entsprach (Terman et al., 1992).

Dabei wurden in HUVE-Zell-RNA, die mit einer *flt-1*-Sonde hybridisiert wurde, zwei Banden mit etwa 7,5 kb und 2,7 kb sichtbar. Nach Hybridisierung mit der *KDR* Sonde war eine Bande von circa 7,0 kb sichtbar.

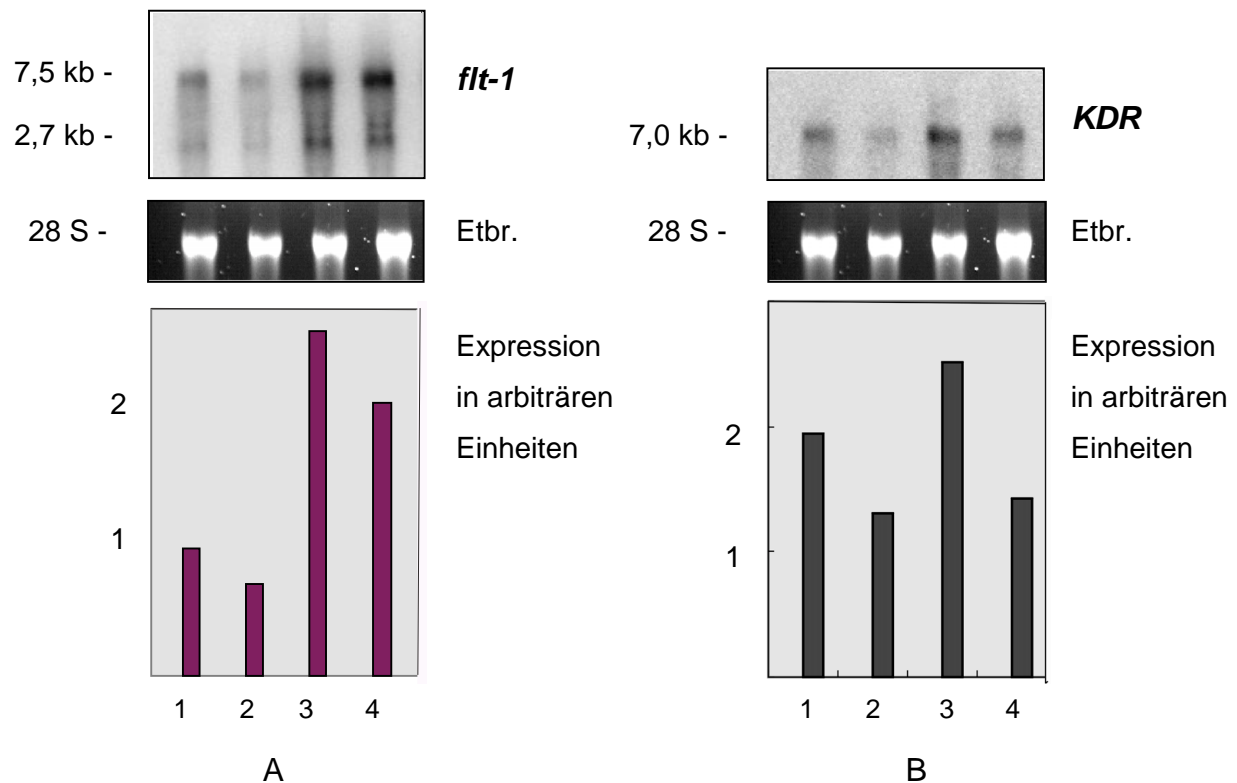


Abb. 3.10: Expression des *flt-1*- und des *KDR*-Gens in HUVE-Zellen in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Die Zellen wurden für acht Stunden bei 100 % und 70 % Konfluenz in verschiedenen Medien kultiviert. Es wurden fünf µg der Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Sonden für *flt-1* (A) und *KDR* (B) hybridisiert und anschließend für 24 Stunden auf dem PhosphorImager-Schirm exponiert. Zur Kontrolle der Ladung wurde eine Ethidiumbromid-Färbung der 28S-RNA durchgeführt.

Spur 1: konfluente Zellen in Mangelmedium; Spur 2: subkonfluente Zellen in Mangelmedium; Spur 3: konfluente Zellen in Wachstumsmedium; Spur 4: subkonfluente Zellen in Wachstumsmedium.

Die Endothelzellen zeigten deutliche Unterschiede in der Genexpression bei verschiedenen Kulturbedingungen. Das *flt-1*-Gen wurde bei Konfluenz in Wachstumsmedium 2,8 x stärker exprimiert als in Mangelmedium. Bei Subkonfluenz war ebenfalls eine Erhöhung der *flt-1*-Expression um 3,1 in Wachstumsmedium zu beobachten. Dabei lag die Expressionshöhe des *flt-1*-Gens in Mangelmedium etwas unter der in Wachstumsmedium (Abb.3.10 A). Auch die Expression des *KDR*-Gens zeigte Unterschiede in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen. In konfluentem Zustand zeigten die Zellen eine um 1,5-fach höhere *KDR*-Expression in Mangelmedium und 1,7-fache in Wachstumsmedium als in subkonfluentem Zustand (Abb.3.10 B).

Die Endothelzellen wurden nach Erreichen der Konfluenz für 48 Stunden in Mangel- oder Wachstumsmedium kultiviert und die Kulturüberstände wurden anschließend in einem immunologischen Test (ELISA) auf die sVEGFR-1-Konzentrationen überprüft.

Die HUVE-Zellen sekretierten nach zwei Tagen Kultur in 4,4 ng/ml sVEGFR-1 in Mangelmedium und 8,4 ng/ml sVEGFR-1 in Wachstumsmedium (Tab. 3.1). Die sVEGFR-1-Konzentration der UtMVE-Zellen lag in Mangelmedium bei 2,2 ng/ml und in Wachstumsmedium bei 3,11 ng/ml (Tab.3.1). Der Kulturüberstand der HDME-Zellen lag bei 0,8 ng/ml in Mangelmedium und 1,8 ng/ml in Wachstumsmedium (Tab. 3.1).

	HUVE-Zellen	UtMVE-Zellen	HDME-Zellen
Mangelmedium	4,4 +/- 2,6 ng/ml	2,2 +/- 0,9 ng/ml	0,76 +/- 0,53 ng/ml
Wachstumsmedium	8,4 +/- 4,1 ng/ml	3,11 +/- 1,7 ng/ml	1,77 +/- 1,18 ng/ml

Tab. 3.1: Die sVEGFR-1-Konzentrationen in Endothelzell-Überständen nach Kultivierung in unterschiedlichen Kulturmedien über 48 Stunden. Die Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration wurde in Duplikaten in einem immunologischen Test (ELISA) bestimmt.

Die Endothelzellen wurden bis knapp zum Erreichen der Konfluenz für 48 Stunden in Mangel- oder Wachstumsmedium kultiviert. Anschließend wurde das Zellysat mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGFR-2 immunpräzipitiert und das VEGFR-2-Protein in der Western Blot Analyse nachgewiesen. Eine Doppelbande, bestehend aus einer größeren, dominanten Bande und einer schwächeren Bande, bei etwa 200 kDa ist charakteristisch in Endothelzellen zum Nachweis des VEGFR-2-Proteins.

Die HUVE-Zellen wiesen eine stärkere Doppelbande bei etwa 230 kDa in Wachstumsmedium auf als in Mangelmedium (Abb. 3.11 A). Ein ähnliches Muster mit einer schwächeren Doppelbande nach Kultivierung in Mangelmedium und einer stärkeren Doppelbande unter Wachstumsmedium konnte in HDME-Zellen (Abb. 3.11 B) und in UtMVE-Zellen (Abb. 3.11 C) gezeigt werden.

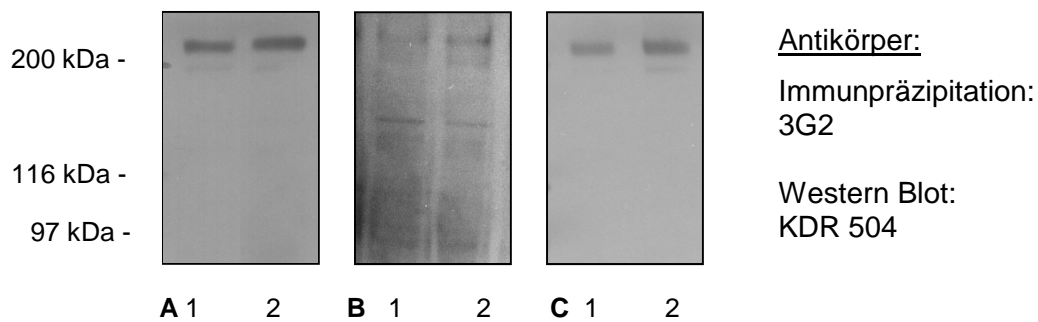


Abb. 3.11: Expression des VEGFR-2-Proteins in humanen Endothelzellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die Zellen wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz in Mangel- (1) oder Wachstumsmedium (2) lysiert und das Lysat nach einem BCA-Test auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Anschließend wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGFR-2 immunpräzipitiert und das VEGFR-2-Protein in der Western Blot Analyse mit einem polyklonalem Antikörper nachgewiesen. (A) HUVE-Zellen, (B) HDME-Zellen, (C) UtMVE-Zellen.

Diese Experimente zeigten, daß sich die Gen- und die Proteinexpression der sVEGFR-1 und der VEGFR-2 in humanen Endothelzellen durch unterschiedliche Mediumzusammensetzungen beeinflussen läßt.

3.3.2 Die Expression der *flt-1*- und *KDR*-Gene in humanen Endothelzellen

Zur Untersuchung der VEGF-Rezeptor-Genexpression in HUVE-Zellen wurden Northern-Blot Analysen unter stringenten Bedingungen durchgeführt, nachdem die Zellen mit Zusatz verschiedener Faktoren kultiviert wurden.

Die HUVE-Zellen wurden in Mangelmedium kultiviert, welches mit VEGF₁₆₅, bFGF und PMA supplementiert wurde, und die Zellen wurden zwischen 0 und 48 Stunden zur RNA-Isolation eingesetzt.

Die HUVE-Zellen zeigten keine Beeinflussung der *KDR*-Expression durch Stimulation mit VEGF. Die *flt-1*-Expression wurde leicht erhöht, die allerdings nach 48 Stunden wieder auf ihren Normalwert gesunken war (Abb.3.12). Die Stimulation mit bFGF führte zu einer Erhöhung der *flt-1*- und der *KDR*-Expression, die nach 24 bzw. acht Stunden ihren Maximalwert erreicht (Abb. 3.13). Die Zugabe von PMA in das Kulturmedium hatte eine geringe Erniedrigung der *KDR*-Expression zur Folge. Die *flt-1*-Expression hingegen stieg stark über den Zeitraum der Kultivierung an. Der Höchstwert lag bei 24 Stunden, danach nahm die Expressionsrate wieder ab (Abb. 3.14).

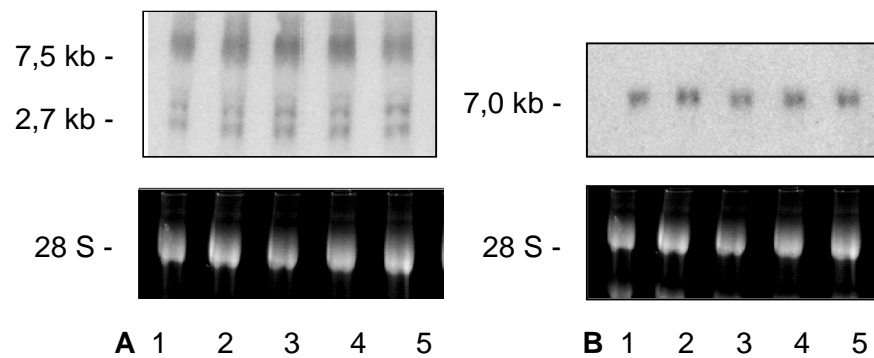


Abb. 3.12: Expression des *flt-1*- und des *KDR*-Gens in HUVE-Zellen nach Stimulation mit VEGF₁₆₅ (10 µg/ml). Die Zellen wurden für 0, 8, 24 und 48 Stunden kultiviert. Es wurden 6 µg der Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Sonden für *flt-1* (A) und *KDR* (B) hybridisiert und mindestens für 24 Stunden auf dem PhosphorImager-Schirm exponiert. Spur 1: 0 Stunden; Spur 2: 2 Stunden; Spur 3: 8 Stunden; Spur 4: 24 Stunden; Spur 5: 48 Stunden.

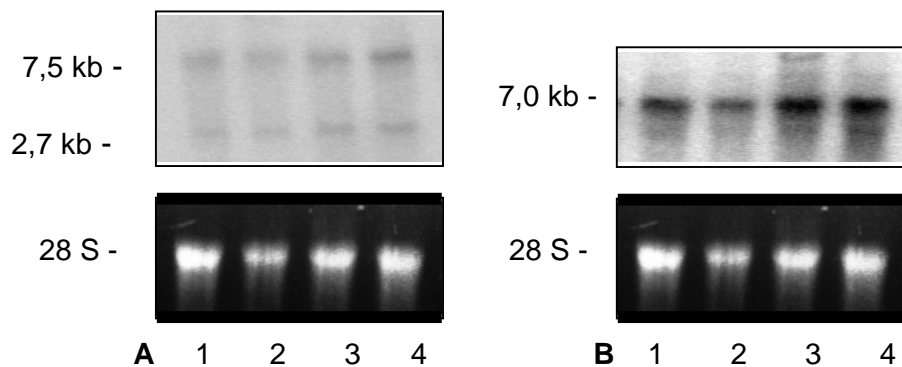


Abb. 3.13: Expression des *flt-1*- und des *KDR*-Gens in HUVE-Zellen nach Stimulation mit bFGF (5 µg/ml). Die Zellen wurden für 0, 2, 8 und 24 Stunden kultiviert. Es wurden 18 µg der Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Sonden für *flt-1* (A) und *KDR* (B) hybridisiert und für 24 Stunden auf dem PhosphorImager-Schirm exponiert. Spur 1: 0 Stunden; Spur 2: 2 Stunden; Spur 3: 8 Stunden; Spur 4: 24 Stunden.

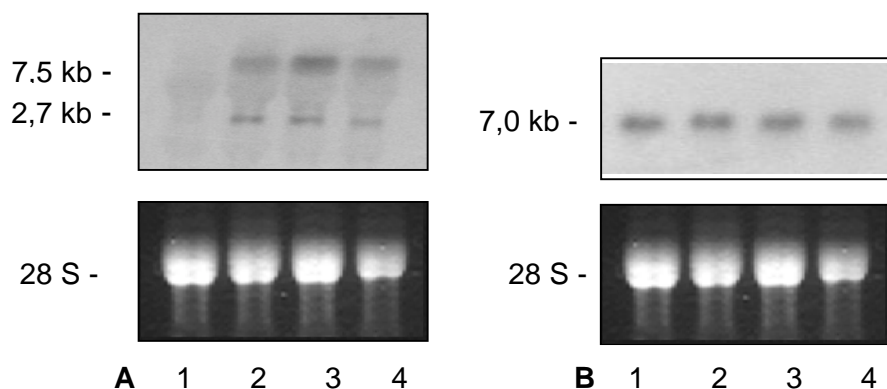


Abb. 3.14: Expression des *flt-1*- und des *KDR*-Gens in HUVE-Zellen nach Stimulation mit PMA (10 ng/ml). Die Zellen wurden für 0, 8, 24 und 48 Stunden kultiviert. Es wurden 10 µg der Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Sonden für *flt-1* (A) und *KDR* (B) hybridisiert und für 24 Stunden auf dem PhosphorImager-Schirm exponiert. Spur 1: 0 Stunden; Spur 2: 8 Stunden; Spur 3: 24 Stunden; Spur 4: 48 Stunden.

Die HUVE-Zellen zeigten keine Veränderung der *flt-1*-Genexpression nach Zugabe von Il-1 alpha, Il-1 beta, Il-6, Inhibin, Progesteron, Östradiol und hCG. Weiterhin wurde kein Einfluß auf die *KDR*-Genexpression nach Stimulation mit Inhibin, Progesteron, aFGF und VEGF₁₆₅ detektiert.

3.3.3 Die Sekretion von sVEGFR-1 in humanen Endothelzellen

Die humanen Endothelzellen sekretieren die lösliche VEGFR-1 Variante in das Kulturmedium, in dem die gesamte sVEGFR-1-Konzentration mittels eines immunologischen Tests (ELISA) bestimmt werden konnte. Durch Kultivierung der Zellen in Medium mit verschiedenen Zusätzen konnte der Einfluß der unterschiedlichen Faktoren untersucht werden.

Die unterschiedlichen Faktoren wurden in drei Gruppen eingeordnet: (1) VEGF-Rezeptoren bindende Wachstumsfaktoren und bFGF, (2) Zytokine, Inhibin und PMA sowie (3) Hormone.

Anhand der sVEGFR-1-Konzentration in Mangelmedium wurden die untersuchten Faktoren eingeordnet, eine Hochregulation bedeutete eine deutliche Erhöhung der sVEGFR-1-Konzentration in dem Kulturüberstand gegenüber dem Mangelmedium.

Die untersuchten Endothelzellen zeigen einen positiven Einfluß durch Stimulation mit VEGF₁₆₅ und die HUVE- und HDME-Zellen lassen ebenfalls diesen Effekt durch Stimulation mit bFGF (Tab. 3.2) erkennen.

	HUVE-Zellen	HDME-Zellen	UtMVE-Zellen
Mangelmedium	●	●	●
bFGF	↑2,1x	↑1,8x	●
VEGF ₁₆₅	↑1,3x	↑1,3x	↑1,7x
PIGF-2	●	●	●

Tab.3.2: Effekte von VEGF-Rezeptor-bindenden Wachstumsfaktoren und bFGF auf die Sekretion sVEGFR-1 in Endothelzellen. Der Kulturüberstand nach drei und fünf Tagen wurde in einem immuologischen Test (ELISA) für Gesamt-sVEGFR-1 in Dublikaten bestimmt.

↑ Anstieg der sVEGFR-1-Sekretion; ↓ Inhibition der sVEGFR-1-Sekretion; ● kein Effekt ermittelt anhand der sVEGFR-1-Sekretion in Mangelmedium.

In der Gruppe mit verschiedenen Medien, Zytokinen und Inhibin zeigte nur eine PMA-Stimulation einen deutlich positiven Effekt auf die Endothelzellen. Die Zugabe von aFGF beeinflusste nur die sVEGFR-1-Sekretion in den HDME-Zellen (Tab. 3.3).

	HUVE-Zellen	HDME-Zellen	UtMVE-Zellen
aFGF	●	↑1,7x	●
Il-1alpha	●	●	●
Il-1beta	●	●	●
Il-6	●	●	●
Inhibin	●	●	●
PMA	↑3,8x	↑1,5x	↑2,3x

Tab. 3.3: Effekte von verschiedenen Medien, Zytokinen und Inhibin auf die Sekretion des sVEGFR-1 in Endothelzellen. Der Kulturüberstand nach drei und fünf Tagen wurde in einem immunologischen Test (ELISA) für Gesamt-sVEGFR-1 in Dublikaten bestimmt.

↑ Anstieg der sVEGFR-1-Sekretion; ↓ Inhibition der sVEGFR-1-Sekretion; ● kein Effekt ermittelt anhand der sVEGFR-1-Sekretion in Mangelmedium.

	HUVE-Zellen	HDME-Zellen	UtMVE-Zellen
Progesteron	●	●	●
Östradiol	●	●	●
hCG	●	●	●
LH	↑1,5x	●	●
FF-Mas	↓0,85x	-	-

Tab.3.4: Effekte von Hormonen und FF-Mas auf die Sekretion des sVEGFR-1 in Endothelzellen. Der Kulturüberstand nach drei und fünf Tagen wurde in einem immunologischen Test (ELISA) für Gesamt-sVEGFR-1 in Dublikaten bestimmt. LH (luteinisierendes Hormon), hCG (humanes Choriongonadotropin), FF-Mas (Meiosis Activating Sterol).

↑ Anstieg der sVEGFR-1-Sekretion; ↓ Inhibition der sVEGFR-1-Sekretion; ● kein Effekt ermittelt anhand der sVEGFR-1-Sekretion in Mangelmedium; - nicht durchgeführt.

Eine Stimulation der Endothelzellen mit unterschiedlichen Peptid- und Steroidhormonen zeigte kaum eine Veränderung der sVEGFR-1-Konzentration gegenüber den Kontrollen. So wurde durch Zugabe von Progesteron, Östradiol oder hCG keine veränderte sVEGFR-1-Konzentration gemessen. Die Stimulation mit LH erhöhte nur die Sekretion

in den HUVE-Zellen, die mikrovaskulären Zellen veränderten die sVEGFR-1-Sekretion nicht unter LH-Einfluß (Tab. 3.4).

FF-Mas (Meiosis Activating Sterol), welches mir freundlicherweise von Frau Dr. Haegele-Hartung zur Verfügung gestellt wurde, zeigte als einziger der eingesetzten Faktoren eine leichte Inhibition der sVEGFR-1-Sekretion (Tab. 3.4).

3.3.4 Die Proteinexpression von VEGFR-2 in humanen Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden 48 Stunden in Mangelmedium kultiviert, dem verschiedene Faktoren zugegeben waren. Mit Hilfe einer Immunpräzipitation mit einem gegen VEGFR-2 gerichteten Antikörper konnte in einem Zellysat das VEGFR-2-Protein nachgewiesen werden.

Die Endothelzellen wurden mit VEGF₁₆₅, bFGF und PMA stimuliert.

Dabei war eine Erhöhung der VEGFR-2-Proteinexpression nach Zugabe von bFGF zu detektieren. Die Bande erschien dabei etwa doppelt so stark wie das Signal der Kontrolle (Abb. 3.15). Diese Erhöhung war bei den HUVE- und den UtMVE-Zellen zu beobachten. Die Stimulation der Zellen mit VEGF₁₆₅ dagegen beeinflusste die VEGFR-2-Expression nicht. Eine geringe Reduzierung der Signalstärke nach Stimulation mit PMA wurde ebenfalls in den drei untersuchten Endothelzelltypen gefunden.

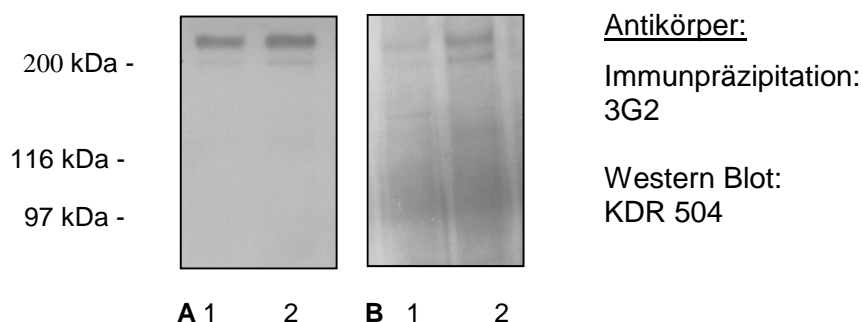


Abb. 3.15: Die Expression des VEGFR-2-Proteins in verschiedenen Endothelzellen nach Stimulation mit bFGF (5 µg/ml). Die Endothelzellen wurden mit (1) und ohne (2) Zugabe von bFGF bis zu 90 % Konfluenz kultiviert und das Zellysat wurde mit einem monoklonalem anti-VEGFR-2 (3G2) Antikörper präzipitiert. Nach SDS-Gelelektrophorese und Filtertransfer wurde VEGFR-2 mit einem polyklonalem Antikörper (KDR 504) im Western Blot nachgewiesen. (A) HUVE-Zellen, (B) UtMVE-Zellen.

3.4 Der Einfluß von Granulosazellen auf Endothelzellen *in vitro*

Im weiblichen Körper wird nach der Ovulation das Corpus luteum überwiegend aus Granulosazellen gebildet. Die Ausbildung einer effizienten Blutversorgung ist Voraussetzung für das Wachstum und die damit verbundenen sekretorischen Leistungen des CL (Carr et al., 1981; Richardson et al., 1989).

Mit Hilfe dieser primären Granulosazellen konnte der Einfluß *in vitro* auf Endothelzellen untersucht werden. Experimentelle Untersuchungen dieser Art sollen Auskunft über mögliche therapeutische Ansätze geben, bei denen die unzureichende oder nicht vorhandene Vaskularisierung des Corpus luteums die Fertilität der Frauen beeinflusst.

3.4.1 Die Kultur humaner Granulosazellen

Die Granulosazellen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Edda Wunsch an der RWTH Aachen gewonnen, indem die Zellen aus Follikelpunktionsflüssigkeiten zur IVF isoliert wurden. Die frisch isolierten Granulosazellen wurden in M199-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert, konnten aber ebenfalls in dem für die Endothelzellen verwendeten Wachstumsmedium kultiviert werden (Abb. 3.16). Granulosazellen proliferieren nicht mehr unter Zellkulturbedingungen, sie lassen sich allerdings auch nach Anheften mittels Trypsin ablösen und kryokonservieren. In Kultur bilden die meist in Zellhaufen vorliegenden Granulosazellen spindelförmige Ausläufer und zeigen ein typisch für diese Zellen granuliertes Zytosol. Eine Granulosazellkultur kann bis zu 14 Tagen überleben, allerdings kann es zu einem Überwachsen von Fibroblasten kommen.

3.4.2 Kokultivierung humaner Endothelzellen mit humanen Granulosazellen

Mit Kokulturen der beiden humanen primären Zelltypen wurde versucht, eine *in vitro* Umgebung nachzustellen, die durch die Verwendung primärer Zellen möglichst einfach der Situation im Ovar nahekam. Die Endothelzellen, die sich *in vivo* nicht in direktem

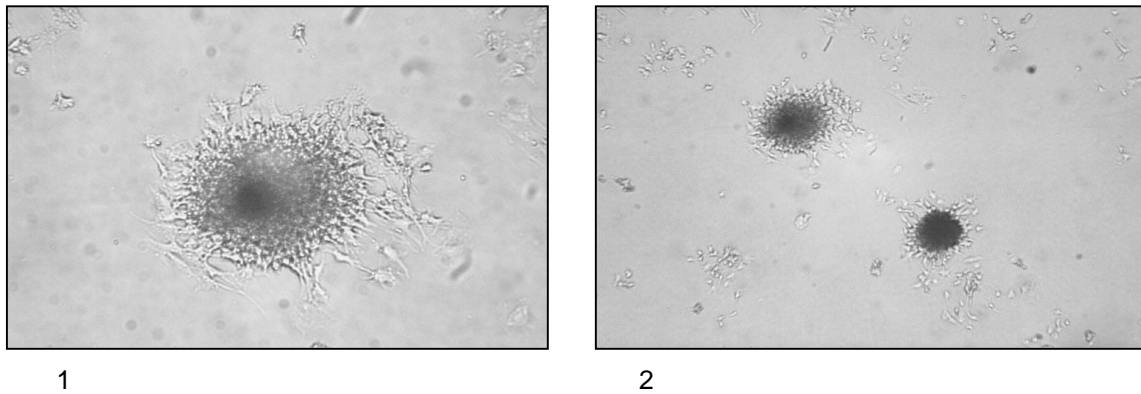


Abb.3.16: Humane Granulosazellen in Kultur. Die Granulosazellen wurden aus Follikelpunktionsflüssigkeiten zur Follikelgewinnung bei der IVF gewonnen, in Wachstumsmedium kultiviert und nach 48 Stunden dokumentiert. Vergrößerung (1) 100-fach; (2) 40-fach.

Kontakt zu den Granulosazellen befinden, wurden auf Ebene der VEGF-Rezeptoren auf mögliche parakrine Veränderungen und Einflüsse seitens der Granulosazellen betrachtet.

3.4.2.1 Die direkte und indirekte Kokultur

Die Kokulturen wurden in zwei verschiedenen Formaten durchgeführt. Bei der direkten Kokultur wurden die beiden Zelltypen im gleichen Kulturgefäß direkt nebeneinander kultiviert. Die indirekte Kokultur ermöglichte lediglich den Austausch löslicher Mediatoren durch das Kulturmedium, da sich die Zellen in zwei unterschiedlichen, durch eine Membran getrennten Kompartimenten befanden.

In der direkten Kokultur wuchsen die Endothelzellen weiter, wie es bisher unter den normalen Kultivierungsbedingungen zu beobachten war. Sie erreichen nach zwei bis vier Tagen abhängig von der Verdünnungsrate die Konfluenz. Die HUVE-Zellen bildeten das charakteristische Kopfsteinpflaster-Muster, die UtMVE-Zellen und HDME-Zellen zeigten die typische Zellform bei Konfluenz wie sie auch in normaler Kultur zu beobachten war.

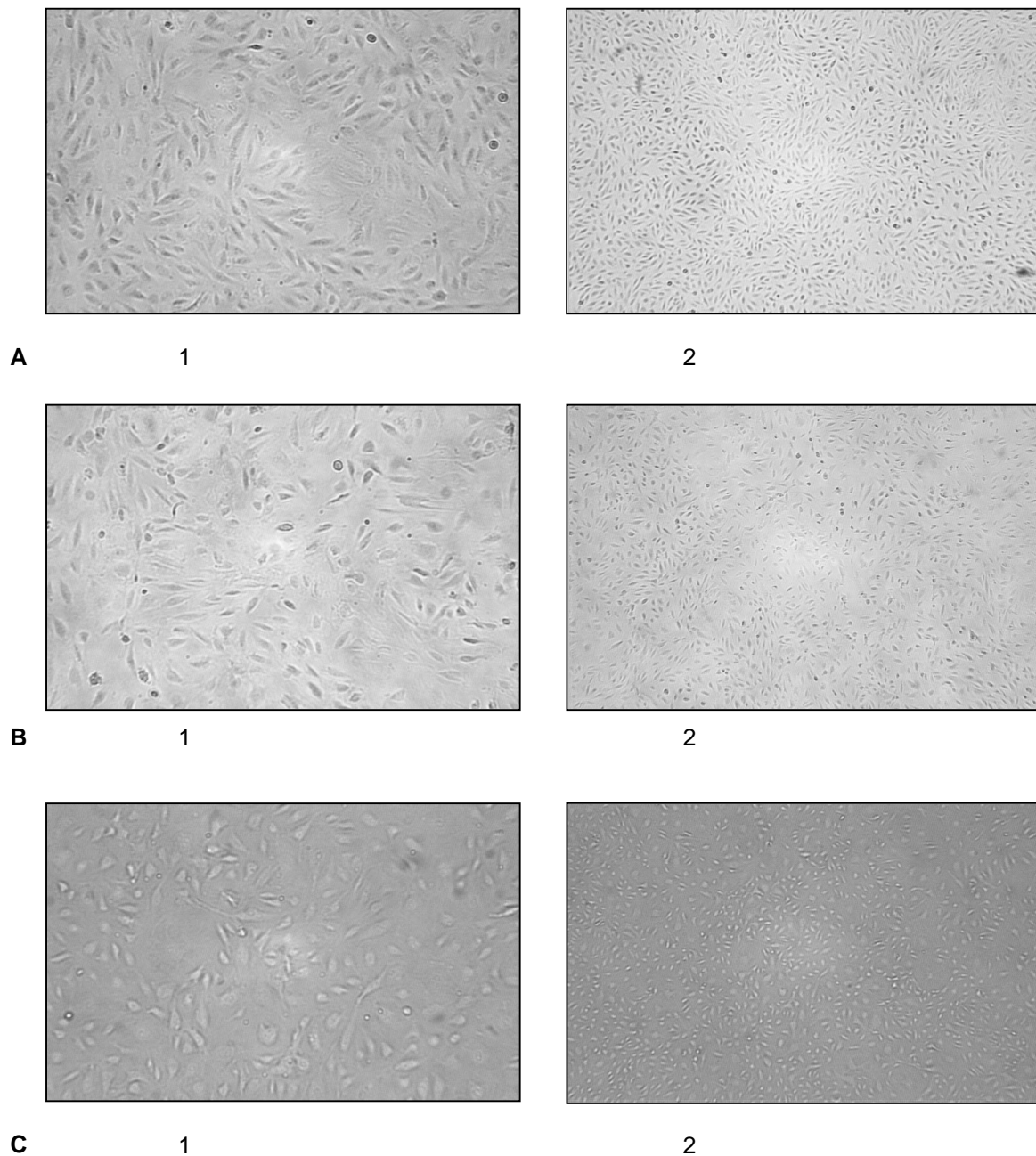
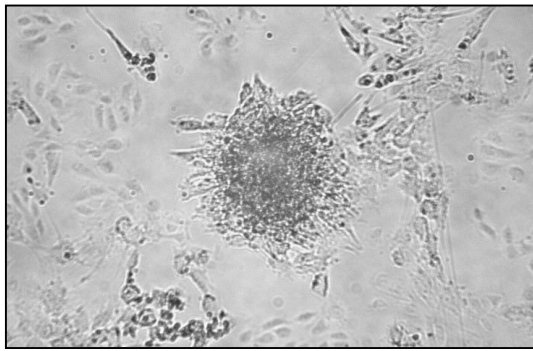
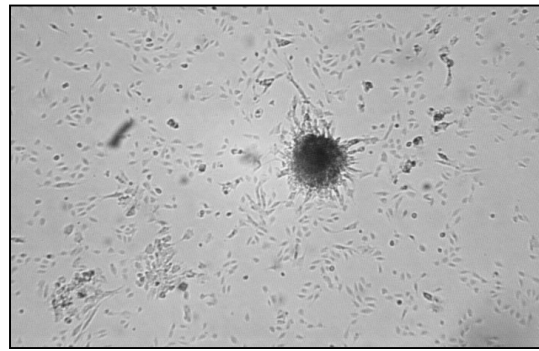


Abb. 3.17: Humane primäre Zellen unter Kulturbedingungen, wie sie später in Kokulturen verwendet wurden. (1) Vergrößerung 100-fach, (2) Vergrößerung 40-fach, (A) konfluente HUVE-Zellen in Passage 5, (B) konfluente UtMVE-Zellen in Passage 4, (C) konfluente HDME-Zellen in Passage 5.

Die Endothelzellen wuchsen zwischen den Granulosazellhaufen, allerdings nur in seltenen Fällen in unmittelbarem Kontakt zu den Zellhaufen. Alle Endothelzelltypen zeigten dieses Wachstum, welches überwiegend einen kleinen Hemm-Hof rund um ein Granulosazellhaufen aussparte (Abb. 3.18-1 bis -3). Die Ausprägung des Hemm-Hofes war bei den HUVE-Zellen am deutlichsten und bei den HDME-Zellen am geringsten ausgeprägt.

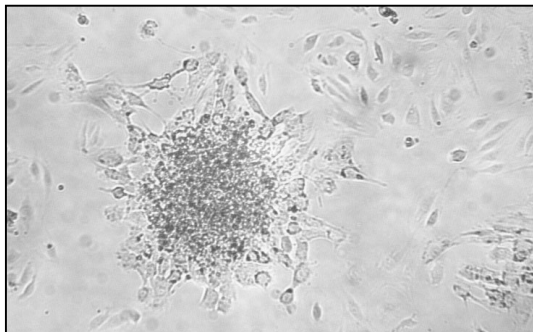


1

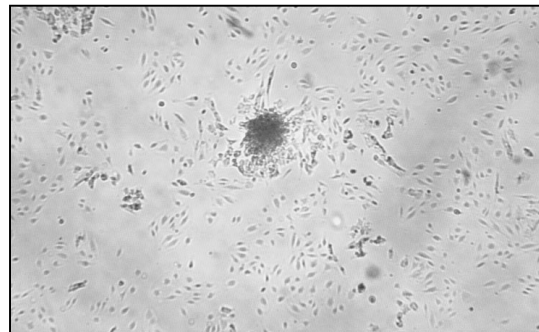


2

Abb. 3.18-1: HUVE-Zellen in direkter Kokultivierung mit humanen primären Granulosazellen. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium über zwei Tage kultiviert und fotografiert. (1) 100-fach, (2) 40-fach.

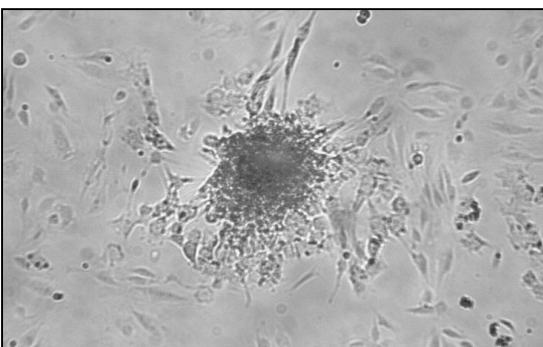


1

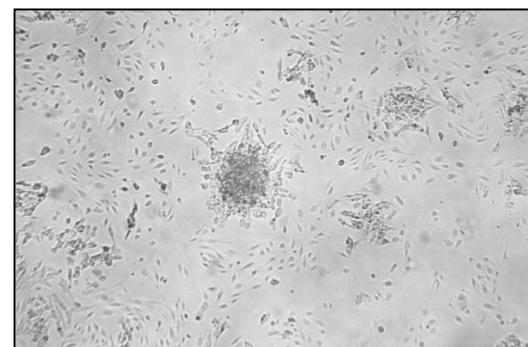


2

Abb. 3.18-2: UtMVE-Zellen in direkter Kokultivierung mit humanen primären Granulosazellen. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium über zwei Tage kultiviert und fotografiert. (1) 100-fach, (2) 40-fach.



1



2

Abb. 3.18-3: HDME-Zellen in direkter Kokultivierung mit humanen primären Granulosazellen. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium über zwei Tage kultiviert und fotografiert. (1) 100-fach, (2) 40-fach.

3.4.2.2 Einfluß der Kokultivierung auf die Expression der VEGF-Rezeptoren

Nachdem die rein mikroskopische Untersuchung der Endothelzellen keine wesentlichen Unterschiede unter Kokulturbedingungen aufwies, wurde die Expressionsrate der VEGF-Rezeptoren untersucht.

Die HUVE-Zellen, die für 24 Stunden in indirekter Kokultur mit Granulosazellen kultiviert wurden, wurden für eine RNA-Isolation benutzt und diese in einer Northern Blot Analyse untersucht.

Die HUVE-Zellen zeigten keine Veränderung der *flt-1*-Genexpression gegenüber der Kontrolle ohne Granulosazellen, nachdem die RNA mit einer spezifischen Sonde für *flt-1* untersucht wurde (Abb. 3.99). Ebenso wies die Genexpression des *KDR* nach 24 Stunden keine Veränderungen auf (Abb. 3.19).

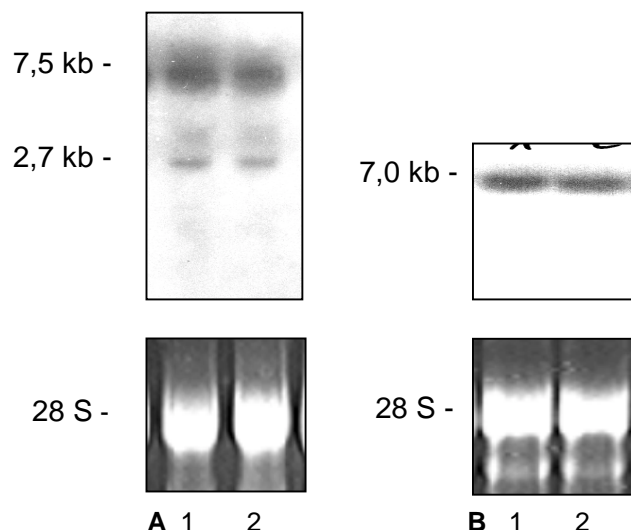


Abb. 3.19: Einfluß der Granulosazellen in indirekter Kokultur auf die Genexpression von *flt-1* und *KDR* in HUVE-Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit und ohne Granulosazellen kultiviert. Es wurden 15µg der Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Sonden für *flt-1* (A) und *KDR* (B) hybridisiert und für mindestens 24 Stunden auf dem PhosphorImager-Schirm exponiert.

Spur 1: ohne Granulosazellen; Spur 2: mit Granulosazellen.

Die Bestimmung der sVEGFR-1-Konzentration in den Kulturüberständen der Kokulturansätze wurde mit einem immunologischen Test (ELISA) für das Gesamt-sVEGFR-1 ermittelt.

Die Granulosazellen alleine zeigten dabei keine detektierbare sVEGFR-1-Freisetzung nach vier Tagen in das Kulturmedium, weder im Granulosazell-Medium noch im Wachstumsmedium.

Die Endothelzellen, die in der direkten Kokultur in Wachstumsmedium kultiviert wurden, sekretierten weniger sVEGFR-1 als die Endothelzellen ohne weiteren Einfluß.

Die sVEGFR-1-Konzentration in den HUVE-Zell-Kulturen stieg kontinuierlich von Tag 1 bis Tag 5, der lösliche Rezeptor akkumuliert im Überstand und verdreifacht sich bis Tag 5. Die sVEGFR-1 Konzentration in Kokulturen zeigte sich von Tag 1 an bis zu Tag 5 nahezu unverändert, es ist nur ein geringer Anstieg von weniger als 16 % zu messen (Abb. 3.20).

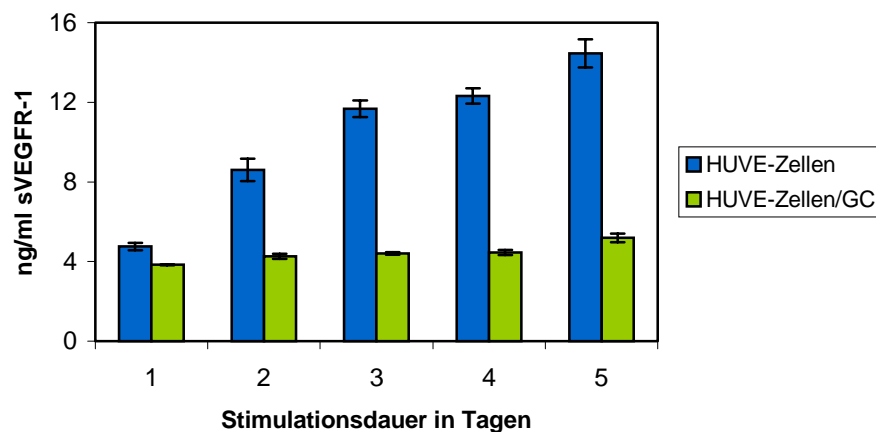


Abb. 3.20: Einfluß der Granulosazellen (GC) in direkter Kokultur auf die Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration in HUVE-Zellen (HUVEC). Die sVEGFR-1-Konzentration der HUVE-Zellen in Kultur an den Tagen 1 bis 5 in Vergleich zu den sVEGFR-1-Konzentrationen der direkten Kokultur aus HUVE-Zellen mit Granulosazellen. Die sVEGFR-1 Konzentration wurde mit einem immunologischen Test (ELISA) für Gesamt-sVEGFR-1 in Duplikaten ermittelt. Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

Die Reduzierung der sVEGFR-1-Konzentration konnte über vier bis fünf Tage in Kulturüberständen mit Basalmedium oder Wachstumsmedium beobachtet werden.

Die Kokultorexperimente mit sterilen Membraneinsätzen, die die Endothel- und Granulosazellen räumlich voneinander trennen, aber einen Austausch des Mediums ermöglichen, wurden von uns als indirekte Kokulturen bezeichnet.

Diese Experimente zeigten ähnliche Veränderungen der sVEGFR-1-Sekretion der Endothelzellen im indirekten Kontakt zu Granulosazellen wie in den direkten Kokulturen: Die sVEGFR-1-Expression war unter dem Einfluß der Granulosazellen signifikant geringer, allerdings war der Effekt weniger ausgeprägt als bei direktem Kontakt der Zellen.

Während sich die sVEGFR-1-Konzentration nach vier Tagen in der indirekten Kokultur um 16 % erhöhte, stieg die Konzentration in Endothelzell-Überständen um 64 % an (Abb. 3.21).

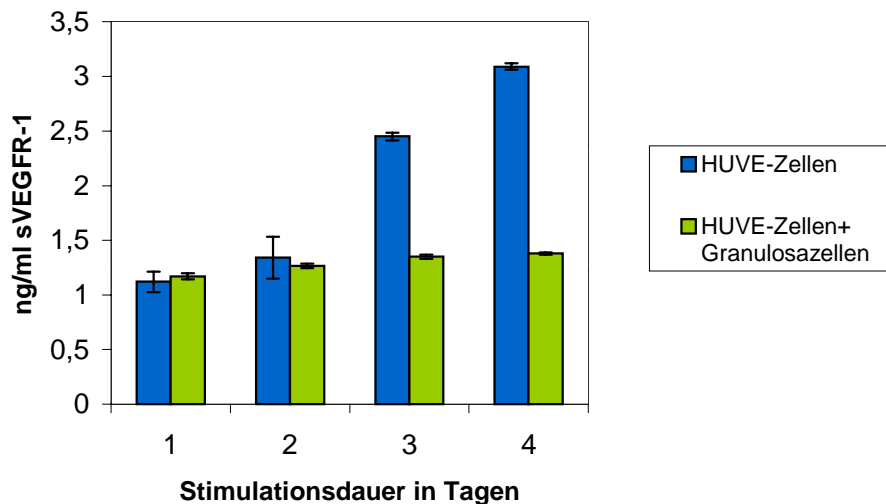


Abb. 3.21: Einfluß der Granulosazellen in indirekter Kokultur auf die Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration in HUVE-Zellen, ermittelt in einem immunologischen Test (ELISA) in Duplikaten. Die sVEGFR-1-Konzentration der HUVE-Zellen Kultur an den Tagen 1 bis 4 in Vergleich zu den sVEGFR-1-Konzentration der direkten Kokultur HUVE-Zellen mit Granulosazellen. Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

3.4.2.3 Direkte Kokultur der Endothelzellen mit weiteren humanen Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses auf die sVEGFR-1-Expression wurden weitere Kokultorexperimente im direkten Format mit HUVE-Zellen durchgeführt. Die untersuchten Zelltypen waren jeweils humane primäre Zellen oder Zelllinien, die in Wachstumsmedium kultivierbar waren und keine sVEGFR-1 Expression zeigten.

Es wurden humane Gingivafibroblasten untersucht, die aus Punktionen des Kieferknochens isoliert und uns freundlicherweise von Herrn Stefan Czichos überlassen wurden. Diese primären Zellen wurden in direkter Weise mit HUVE-Zellen kultiviert und zeigten ein vergleichbares Freisetzungsmuster des sVEGFR-1. Die sVEGFR-1-Konzentration in den Kulturüberständen der Kokulturen lag deutlich höher als die der Endothelzellen. Der sVEGFR-1-Gehalt lag an Tag 3 und an Tag 5 zwischen 41 und 52 % höher in den Kulturen mit den Gingivafibroblasten (Abb.3.22).

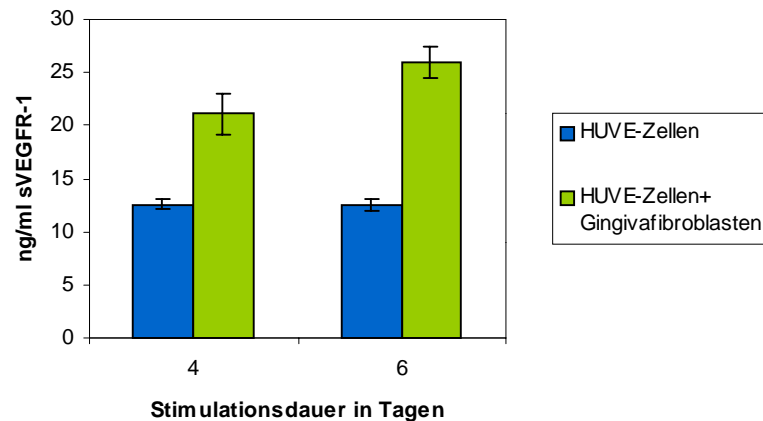


Abb. 3.22: Die Gesamt-Konzentration des löslichen VEGFR-1 in HUVE-Zellen in direkter Kokultur mit humanen Gingivafibroblasten, ermittelt in einem immunologischen Test (ELISA) in Duplikaten. Die sVEGFR-1-Konzentration der HUVE-Zellen Kultur an den Tagen drei und fünf in Vergleich zu den sVEGFR-1-Konzentration der Kokultur HUVE-Zellen mit Gingivafibroblasten. Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

Die hFOB-Zellen sind Osteoblasten-Vorläuferzellen, die aus der Nabelschnur gewonnen wurden und durch das Einfügen des *large T* Gens Temperatur-abhängig zu differenzieren beginnen (Hofbauer et al., 1998). Sie wurden gemeinsam mit HUVE-Zellen über fünf Tage in direkter Kokultur kultiviert.

Die ohne hFOB kultivierten HUVE-Zellen zeigten im Vergleich zur Kokultur HUVE-Zellen mit hFOB eine geringere Freisetzung des löslichen Rezeptorproteins. Die sVEGFR-1-Konzentration in den Kokulturen mit hFOB ist am Tag 3 um etwa 32 % erhöht und am Tag 5 etwa 47 % höher gegenüber den reinen HUVE-Zellen-Kulturen (Daten nicht gezeigt).

3.4.3 Einfluß der GC konditionierten Medien auf primäre Endothelzellen

Eine Veränderung der sVEGFR-1-Sekretion der Endothelzellen konnte nicht nur in direkten, sondern auch in indirekten Kokulturen mit Granulosazellen beobachtet werden. Der Effekt auf den löslichen VEGFR-1 konnte folglich durch einen löslichen Mediator im Kulturmedium vermittelt werden, so daß weitere Untersuchungen mit den von Granulosazellen konditionierten Medium vorgenommen werden konnten.

3.4.3.1 Einfluß der GC-konditionierten Medien auf die Mitogenität von Endothelzellen

Um einen möglichen Einfluß der konditionierten Medien auf das Proliferationsverhalten der Endothelzellen zu beobachten, wurden Mitogenitäts-Tests durchgeführt. Dazu wurde Endothelzellmedium (Basalmedium) mit Kulturüberständen, die 48 bis 72 Stunden von den Granulosazellen konditioniert wurden, mit 10 bis 70 % supplementiert. Dabei wurden keine Unterschiede zu unkonditioniertem Kontrollmedium detektierbar, wenn das Basalmedium mit bis zu 30 % supplementiert war. Bei 40 % oder mehr zugesetztem Medium starben die Endothelzellen ab, da der Anteil des M199-Mediums zu hoch war. Eine 30%-ige Zugabe des zu untersuchenden Mediums hatte eine erhöhte DNA-Synthese zur Antwort, die auf Serumeffekte zurückzuführen ist. Die Ergebnisse mit dem Kontrollmedium ohne Granulosazellen und mit den konditionierten Mediums waren gleich.

3.4.3.2 Einfluß der Granulosazellen konditionierten Kulturüberständen auf die Transkription der VEGF-Rezeptoren

Da im sich entwickelnden Corpus luteum das Einsprossen neuer Kapillaren zu beobachten ist und die VEGF-Rezeptoren bei der Proliferation der Endothelzellen eine zentrale Rolle spielen, wurde der Einfluß der von Granulosazellen konditionierten Medien auf deren Expression untersucht. Mit Hilfe der Northern Blot Analyse wurde die Expression der *flt-1* und *KDR* in HUVE-Zellen untersucht, um mögliche Veränderungen der Transkriptionsrate zu erkennen.

Die Zugabe von Granulosazell-konditionierten Medium zum Endothelzellmedium bewirkte keine Veränderung der Genexpressionsrate des *flt-1* im Vergleich mit den Kontrollexperimenten mit unkonditioniertem Granulosazellmedium innerhalb von 24 Stunden. Es fand keine detektierbare Veränderung der Signale der 7,4 kb sowie der kleineren 2,7 Transkripte statt (Abb. 3.23).

Die Analyse der 7,0 kb Transkripte für *KDR* nach Inkubation der HUVE-Zellen mit Granulosazell-Überstand und Kontrollmedium über 24 Stunden zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.23).

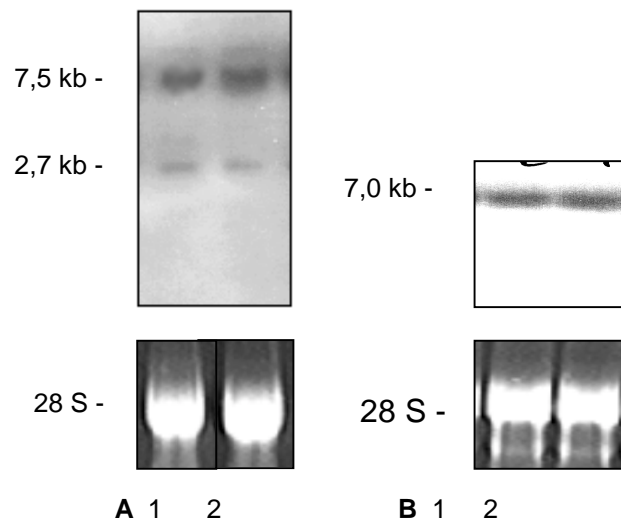


Abb. 3.23: Expression des *flt-1*- und des *KDR* -Gens in HUVE-Zellen nach Inkubation mit granulosazell-konditioniertem Medium. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit granulosazell-konditioniertem Medium und Kontrollmedium kultiviert. Es wurden 15µg der Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen und mit spezifischen Sonden für *flt-1* (A) und *KDR* (B) hybridisiert und anschließend für 24 Stunden auf dem PhosphorImager-Schirm exponiert. Zur Kontrolle der Ladung wurde eine Ethidiumbromid-Färbung der 28S-RNA durchgeführt.
Spur 1: granulosazell-konditioniertem Medium; Spur 2: Kontrollmedium.

Anhand von Kontrollen durch Ethidiumbromid-Färbung der 28S-RNA konnte von einer einheitlichen RNA-Menge pro Spur ausgegangen werden.

3.4.3.3 Einfluß der Granulosazell-Kulturüberstände auf die Sekretion von sVEGFR-1

Mit Hilfe eines immunologischen Tests (ELISA), der die Gesamtkonzentration des löslichen Rezeptorproteins bestimmt, wurde der Effekt eines Kulturüberstandes von Granulosazellen auf diese Expression auf Endothelzellen untersucht. Die Endothelzellen wurden in Mangel- oder Wachstumsmedium kultiviert, dem 30 % des zu untersuchenden Medium zugesetzt war. Dieses Medium war das entweder bis zu sieben Tagen auf Granulosazellen konditioniertes Medium oder unkonditioniertes Kontrollmedium.

Im Überstand der Endothelzellen war nach drei bis fünf Tagen Kultivierung mit und ohne Granulosazell-Überstand eine unterschiedliche Konzentration des sVEGFR-1 zu detektieren. Die Endothelzellen, die mit granulosazellen-konditionierten Medium kultiviert wurden, zeigten eine geringere sVEGFR-1-Konzentration. Die sVEGFR-1-Konzentration war um etwa 54 bis 35 % gegenüber den Endothelzellen mit Kontrollmedium reduziert (Abb.3.24).

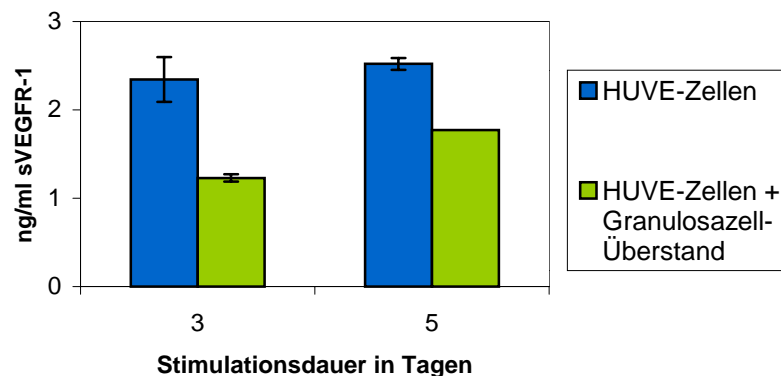


Abb.3.24: Die sVEGFR-1-Sekretion von HUVE-Zellen, die mit granulosazell-konditioniertem Medium kultiviert wurden. Mit Hilfe eines immunologischen Tests (ELISA) wurde die Gesamtkonzentration des löslichen VEGFR-1 bestimmt (in Duplikaten). Die HUVE-Zellen wurden über drei bis fünf Tage in Wachstumsmedium kultiviert, das mit 30 % Granulosazell-Kulturüberstand oder Kontrollmedium supplementiert war. Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

3.4.3.4 Einfluß der Granulosazell-Kulturüberstände auf die Expression von VEGF-2-Rezeptoren

Mittels einer Immunpräzipitation konnte der Einfluß der konditionierten Granulosazellmedien auf die Expression des VEGFR-2 auf Endothelzellen beobachtet werden.

Die subkonfluenten Endothelzellen wurden 48 Stunden in Wachstumsmedium kultiviert, welches mit 30 % Granulosazell-Kulturüberstand oder Kontrollmedium supplementiert wurde. Die anschließende Immunpräzipitation wurde mit einem gegen VEGFR-2 gerichteten monoklonalem Antikörper durchgeführt, um die Rezeptorproteine aus dem Zellysat zu präzipitieren. Das Präzipitat wurde im Western Blot mit einem polyklonalen anti-VEGFR-2 Antikörper detektiert.

Die charakteristische Doppelbande des VEGFR-2-Proteins ist in allen Endothelzell-Lysaten zu beobachten. In jeder Spur wurde die gleiche Proteinmenge eingesetzt, die zuvor mit Hilfe des BCA-Tests ermittelt wurde.

Es waren keine signifikanten Veränderungen in der Expression des VEGFR-2 zu detektieren, in den unterschiedlichen Ansätzen mit und ohne Granulosazell-konditioniertem Medium weisen die Proteinbanden eine nahezu gleiche Intensität auf. Nicht nur in den HUVE-Zellen, sondern auch in den UtMVE-Zellen und HDME-Zellen, ist nach einer Inkubation von zwei Tagen der VEGFR-2 nachzuweisen, aber er zeigte keine unterschiedlichen Expressionsraten (Abb. 3.25)

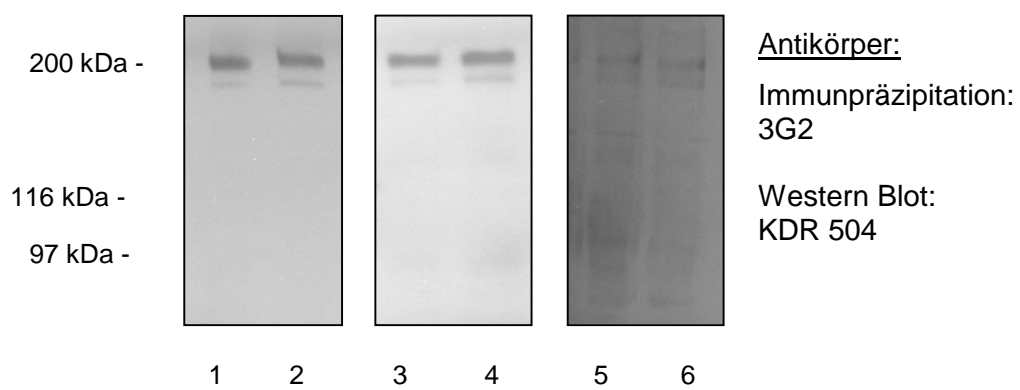


Abb. 3.25: Die Proteinexpression des VEGFR-2 in Endothelzellen nach Inkubation mit Granulosazell-Überstand. Die HUVE-Zellen (1, 2), UtMVE-Zellen (3,4) und HDME-Zellen (5,6) wurden zwei Tage mit Granulosazell-Überstand (2, 4, 6) oder Kontrollmedium (1, 3, 5) inkubiert. Das Zellysat wurde mit einem monoklonalen anti-VEGFR-2 (3G2) Antikörper immunpräzipitiert und nach einer SDS-Gelelektrophorese im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper (KDR 504) nachgewiesen.

3.4.3.5 Einfluß der modifizierten Granulosazell-Kulturüberstände auf Endothelzellen

Zu Charakterisierung des löslichen Faktors, der die sVEGFR-1-Sekretion in Endothelzellen beeinflusst, wurde der Granulosazell-Überstand unterschiedlich behandelt.

Die Granulosazell-Kulturüberstände wurden weiterhin neben dem Kontrollmedium zur Supplementierung des Wachstumsmediums genutzt, allerdings wurden sie einigen Veränderungen unterzogen. Die Modifikationen sollten weitere Informationen über den löslichen Mediator im Granulosazell-Überstand geben. Aliquote der Granulosazell-Kulturüberstände wurden bei 95°C inkubiert, um durch eine eventuelle Hitzeempfindlichkeit den Einfluß auf die sVEGFR-1 Expression zu verändern. Weiterhin wurden die

Granulosazell-Kulturüberstände durch eine Membran zentrifugiert, die nur Moleküle mit einer Größe von weniger als 10 000 Da passieren konnten. Diese Prozedur diente der Größeneinschätzung des möglichen Mediators. Durch den Einsatz von Heparin-Sepharose wurden die Granulosazell-Kulturüberstände auf Heparin-bindende Faktoren untersucht. Nach Bindung an Heparin konnten diese Proteine durch Zentrifugation entfernt werden.

Nach Inkubation der Endothelzellen über fünf Tage mit diesen modifizierten Granulosazell-Überständen wurde die Konzentration des sVEGFR-1 bestimmt, um mögliche Effekte zu beobachten.

Die HUVE-Zellen exprimierten weiterhin deutlich weniger sVEGFR-1, wenn sie mit dem unbehandelten Granulosazell-Überstand inkubiert wurden. Allerdings zeigten die HUVE-Zellen eine ähnliche sVEGFR-1-Sekretion in allen modifizierten Granulosazell-Überständen wie in dem nicht modifizierten Granulosazell-Überstand. Sie lag zwischen 39 und 48 % unter der sVEGFR-1-Konzentration der Kontrollzellen ohne Granulosazell-konditioniertem Medium (Abb.3.26).

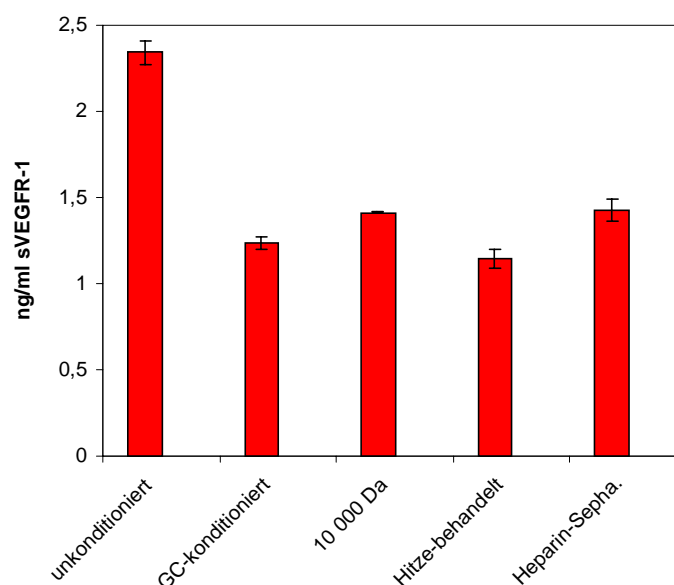


Abb. 3.26: Die sVEGFR-1-Konzentration der HUVE-Zellen nach Inkubation mit Granulosazell-Überstand, welcher verschiedenen Modifikationen unterzogen wurde. Die sVEGFR-1-Konzentration wurde nach fünf Tage mit einem immunologische Test (ELISA) für freies und komplexiertes sVEGFR-1 bestimmt (Duplikate). Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

3.4.4 Effekte der humanen Granulosazelllinie HO-23 auf primäre Endothelzellen

Um die bereits gewonnenen Erkenntnisse über den Einfluß der primären Granulosazellen auf die Endothelzellen zu ergänzen, wurde zusätzlich eine gut charakterisierte Granulosazelllinie für die Untersuchungen eingesetzt.

3.4.4.1 Die humane Granulosazelllinie HO-23

Die Granulosazelllinie wurde aus humanen primären Granulosazellen etabliert, die bei der In Vitro Fertilisation gewonnen wurden. Durch Transfektion mit typischen Krebsgenen zur Immortalisierung wurde die Granulosazelllinie HO-23 etabliert (Hosokara et al., 1998). Diese Zellen zeigen noch wie die primären Granulosazellen eine Erhöhung der Progesteronproduktion nach Stimulation mit hCG. Die Zellen wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Amsterdam überlassen.

Da diese Zelllinie in dem für Endothelzellen verwendeten Wachstumsmedium kultivierbar war, wurde sie für Kokultur-Experimente eingesetzt, um die Ergebnisse mit den primären Granulosazellen zu ergänzen. In HO-23-Überständen, die 48 Stunden konditioniert wurden, konnte im immunologischen Test (ELISA) für sVEGFR-1 kein lösliches Rezeptorprotein nachgewiesen werden.

3.4.4.2 Einfluß der Kokultivierung mit HO-23 auf die sVEGFR-1-Sekretion in Endothelzellen

Nach direkten Kokultur-Experimenten wurde mit einem immunologischen Test (ELISA) überprüft, ob die HO-23-Zellen ebenfalls einen Einfluß auf die sVEGFR-1-Sekretion der Endothelzellen ausüben.

Die HO-23 zeigten dabei einen ähnlichen Einfluß wie die primären Granulosazellen, denn in den Kokulturüberständen wurden geringere Konzentrationen des sVEGFR-1 gefunden. Die Endothelzellen sekretierten bei direktem Kontakt zu den HO-23-Zellen weniger sVEGFR-1 als in reiner Endothelzellkultur.

Nach vier und sechs Tagen Kokultivierung der HO-23-Zellen mit UtMVE-Zellen liegt stets die sVEGFR-1-Konzentration unter der der UtMVE-Zellen-Kultur (Abb.3.27).

Dabei ist der Unterschied mit etwa 49 bis 24 % weniger ausgeprägt als bei den primären Granulosazellen.

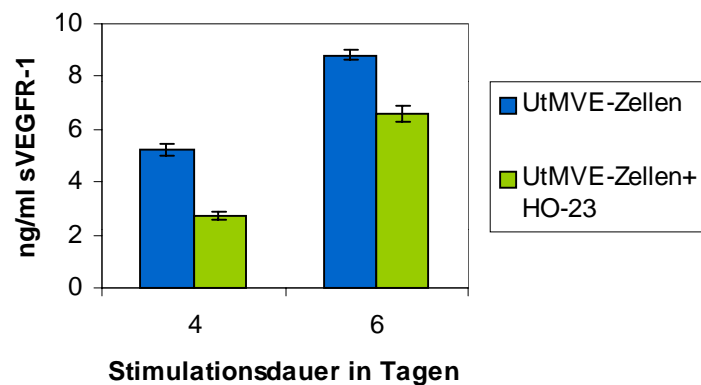


Abb. 3.27: Die Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration in UtMVE-Zellen in direkter Kokultur mit HO-23-Zellen, ermittelt in einem immunologischen Test (ELISA) in Duplikaten. Die sVEGFR-1-Konzentration der HUVE-Zellen in Kultur an den Tagen 4 und 6 in Vergleich zu den sVEGFR-1-Konzentration der Kokultur HUVE-Zellen mit HO-23-Zellen. Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

3.4.4.3 Einfluß der HO-23-konditionierten Kulturüberstände auf die sVEGFR-1 Expression

Um einen weiteren Vergleich zu den primären Granulosazellen zu erhalten, wurden von den HO-23-Zellen konditionierte Medien hergestellt.

Dieses konditionierte Medium wurde neben dem Kontrollmedium ohne HO-23 Zellen für die Inkubation auf Endothelzellen genutzt, um die sVEGFR-1-Sekretion zu beobachten. Weiterhin wurde das HO-23-konditionierte Medium verschiedenen Modifikationen unterzogen, um den sVEGFR-1 beeinflussenden Faktor zu bestimmen. Das HO-23-konditionierte Medium wurde Hitze-behandelt, durch eine Membran zentrifugiert, die nur Moleküle mit einer Größe unter 10 kDa passieren läßt und mit Heparin-Sepharose behandelt.

Die HUVE-Zellen exprimierten ohne den Einfluß des HO-23 konditionierten Mediums 69 % mehr sVEGFR-1 als unter Einfluß der HO-23-Zellen. Auch die modifizierten HO-23-Kulturüberstände verloren durch die unterschiedlichen Behandlungsweisen nicht ihren inhibierenden Effekt auf die sVEGFR-1-Sekretion. Sie verringerten weiterhin die sVEGFR-1-Expression durch die Hitzebehandlung um 81 %, durch die Ausschluß-Membran um 62 % und durch die Heparin-Sepharose um etwa 67 % (Abb.3.28).

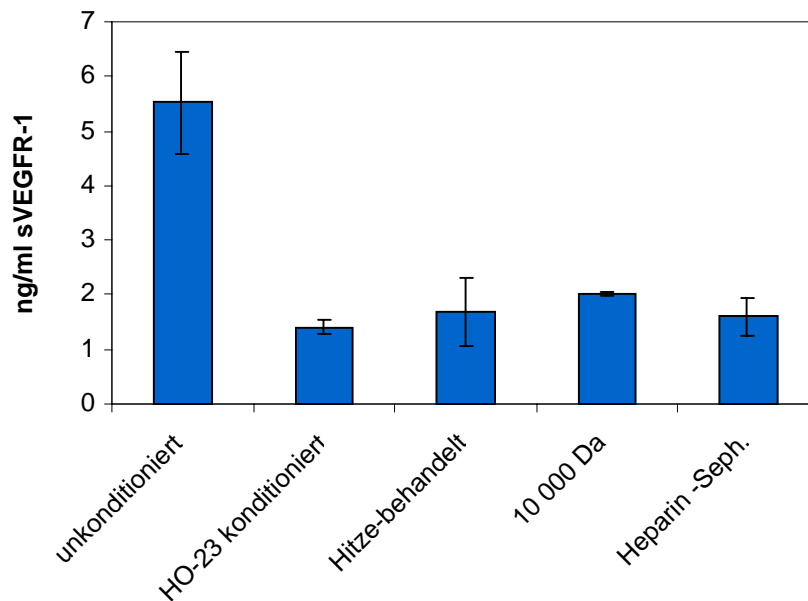


Abb. 3.28: Die sVEGFR-1 Konzentration der HUVE-Zellen nach Inkubation mit HO-23-konditioniertem Medium, welches verschiedenen Modifikationen unterzogen wurde. Die sVEGFR-1 Konzentration wurde nach 5 Tagen mit einem immunologischen Test (ELISA) für freies und komplexiertes sVEGFR-1 bestimmt (Duplikate). Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

3.5 Untersuchungen von Realproben aus dem Ovar

Durch die Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Neulen RWTH Aachen standen nicht nur humane Granulosazellen zur Verfügung, die bei der Follikelpunktion Oozytengewinnung zur In Vitro Fertilisation (IVF) gewonnen wurden, sondern auch dabei anfallende Follikelpunktionsflüssigkeiten. Die Granulosazellen exprimieren VEGF (Yan et al., 1993). Da dies in den Follikelflüssigkeiten in großen Mengen detektiert werden kann, wurden die Follikelflüssigkeiten auf das Vorkommen des sVEGFR-1, der eine große Affinität zu VEGF zeigt, untersucht.

3.5.1 Vorkommen der löslichen Form des VEGFR-1 in Follikelflüssigkeiten

Mit Hilfe des ELISA-Tests, der die lösliche Rezeptorvariante sVEGFR-1 erkennt, konnte in den unverdünnten Follikelflüssigkeiten das Rezeptorprotein nachgewiesen werden. Jede vermessene Probe enthielt den löslichen VEGFR-1. Dabei variierten die Werte der sVEGFR-1-Konzentration von 0,5 ng/ml bis 5,5 ng/ml. Diese Werte liegen im

Meßbereich der Kallibrierkurve der Gesamtkonzentration löslichen Rezeptorproteins, der frei und unkomplexiert oder dessen Bindungsstellen mit einem Liganden blockiert sind. Die Bestimmung des freien und nicht gebunden vorliegenden Rezeptors in einem anderen Testformat ergab nur eine sehr geringe Konzentration des unkomplexiert vorliegenden sVEGFR-1. Die Konzentration lag außerhalb des unteren Detektionslimits von 0,3 ng/ml sVEGFR-1.

Das lösliche Rezeptorprotein liegt in den bei der Punktion der Follikel gewonnenen Flüssigkeiten überwiegend in komplexierter Form vor.

3.5.2 Die sVEGFR-1-Konzentration in Follikelpunktionsflüssigkeiten für die IVF-Oozytengewinnung

Es folgte eine Untersuchung der sVEGFR-1 Konzentration in Follikelflüssigkeiten, um etwaige Zusammenhänge zwischen der Follikelanzahl und dem Verhältnis VEGF-A/sVEGFR-1 zu beleuchten. Eine übermäßige VEGF-Produktion wird im Zusammenhang mit dem ovariellen Hyperstimulationssyndrom (OHSS) beschrieben (Shweiki et al., 1993). Das OHSS tritt bei 0,3 bis 5 % aller hormonell stimulierten IVF-Zyklen auf (Schenker und Weinstein, 1978)

Während der sonografischen Untersuchung der IVF-Patientinnen wurden diese in Gruppen eingeteilt, die sich nach der Anzahl der reifenden Follikel im Ovar richteten und somit auf den Grad der Stimulation hinwiesen. Nach Punktion der Follikel und Entnahme der Cumuluskomplexe wurden die Follikelflüssigkeiten den drei Gruppen zugeordnet und ausgewertet (Tab. 3.9):

Gruppe	Follikelanzahl (FA)	Bezeichnung	Patientinnen
A	1 bis 4	geringe FA	n=22
B	5 bis 10	durchschnittliche FA	n=21
C	mehr als 10	hohe FA	n=26

Tab. 3.9: Einordnung der Cumuluskomplexe anhand der Anzahl der punktierten Follikel.

Die Bestimmung der Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration der unverdünnten Punktate wurde in einem immunologischen Test (ELISA) ermittelt. Die Konzentrationen lagen im

charakteristischem Bereich der Follikelpunktate zwischen 0,4 ng/ml und 5,5 ng/ml sVEGFR-1. Nach Bestimmung des Konzentrationsmittelwertes einer Gruppe wurden folgende Werte ermittelt (Tab. 3.10):

Gruppe	Follikelanzahl	sVEGFR-1 Konzentration	Abweichung
A	1 bis 4	4,2ng/ml	-/+ 1,1ng/ml
B	5 bis 10	2,1ng/ml	-/+1,5ng/ml
C	mehr als 10	1,1ng/ml	-/+ 1,0ng/ml

Tab. 3.10 :Die sVEGFR-1-Konzentrationen in Follikelpunktaten nach Einordnung in verschiedene Gruppen nach Follikelanzahl. Die Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration wurde in Duplikaten in einem immunologischen Test (ELISA) ermittelt. Die Abweichungen zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

Die sVEGFR-1-Konzentration der Gruppe A war doppelt so hoch wie die der Gruppe B und 3,8-fach höher als die Konzentration der Gruppe C. Nach Zuordnung der Rezeptorwerte zu den Gruppen mit geringer, durchschnittlicher und höher Cumuluskomplexanzahl ergab sich eine umgekehrt proportionale Korrelation zwischen der Anzahl der Cumuluskomplexe und sVEGFR-1-Konzentration (Abb.: 3.29).

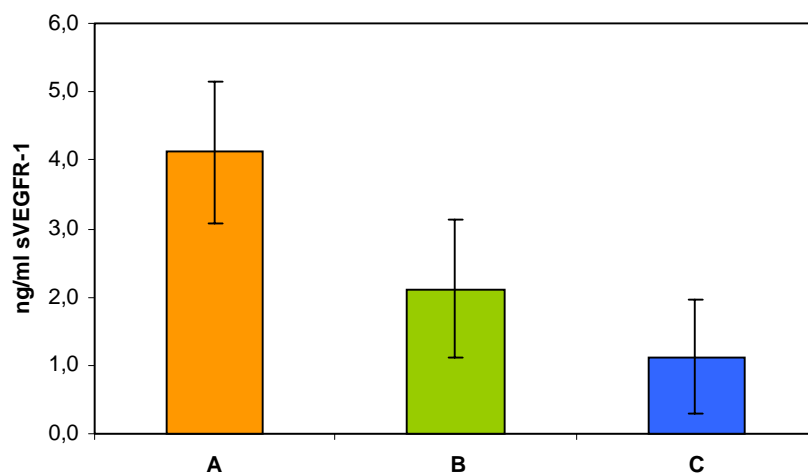


Abb. 3.29: Die sVEGFR-1-Konzentration in Follikelpunktaten nach Bestimmung der Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration durch einen immunologischen Test (ELISA in Duplikate). Die Einteilung in die 3 Gruppen erfolgte nach Anzahl der punktierten Follikel: Gruppe A: ein bis vier Follikel; Gruppe B: fünf bis zehn Follikel; Gruppe C: mehr als zehn Follikel. Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

Die Follikelflüssigkeiten der Patientinnen mit geringer Anzahl von Oozyten wiesen eine deutlich höhere sVEGFR-1-Konzentration auf als die Follikelpunktate der Frauen mit besonders vielen Cumuluskomplexen. Die Korrelation der beiden Parameter wurde deutlicher, indem die Rezeptorkonzentration auf die konkrete Anzahl der gewonnenen Oozyten bezogen wurde und nicht nur eine Einteilung in drei verschiedene Gruppen anhand der durchschnittlichen Oozytenanzahl. Die sVEGFR-1-Mittelwerte wurden durch die durchschnittliche Oozytenanzahl geteilt (Tab.3.11):

Gruppe	Follikelanzahl	sVEGFR-1 Konzentration
A	1 bis 4	1,17 ng/Oozyte
B	5 bis 10	0,25 ng/Oozyte
C	mehr als 10	0,08 ng/Oozyte

Tab.3.11: Die sVEGFR-1-Konzentrationen in Follikelpunktaten. Die Bestimmung der Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration mit einem immunologischen Test (ELISA) unter Berücksichtigung der Oozytenanzahl.

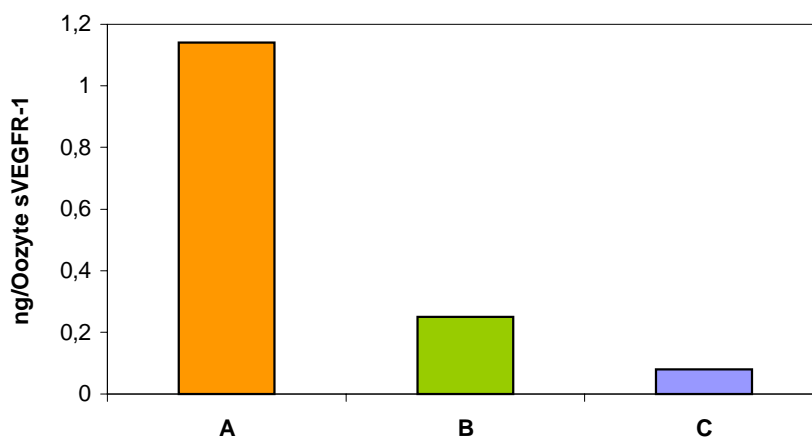


Abb.3.30: Die sVEGFR-1-Konzentrationen in Follikelpunktaten unter Berücksichtigung der Oozytenanzahl. Die Konzentration des löslichen Rezeptorproteins wurde in einem immunologischen Test (ELISA) in Duplikaten ermittelt und in die Gruppen anhand der Follikelanzahl eingeordnet.

Es zeigten auch die Proben mit den höchsten Konzentrationen an komplexiertem sVEGFR-1 nur eine sehr geringe Menge (nicht detektiertbar bis 0,25 ng/ml) an freiem und unkomplexiertem sVEGFR-1.

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Neulen aus Aachen wurden die VEGF-Konzentrationen der Follikelpunkate ermittelt. Die gleichen Proben wurden in einem kommerziellen ELISA für freies VEGF (R&D Systems, Wiesbaden) in der gleichen Zuordnung auf ihre VEGF-Konzentration untersucht. Die Messung wurde von Frau Dr. Edda Wunsch mit unverdünnten Proben durchgeführt.

Die VEGF-Konzentrationen der Follikelflüssigkeiten lagen zwischen 0,9 ng/ml und 6,9 ng/ml VEGF. Die Mittelwerte der drei Gruppen zeigen eine ähnliche Koorelation wie die sVEGFR-1-Konzentrationen. Die Gruppe A besaß die größte VEGF-Konzentration, die VEGF-Konzentrationen lagen um 15 % bei Gruppe B und um 12 % in Gruppe C unter den VEGF-Werten der Gruppe A (Tab.3.12).

Gruppe	Follikelanzahl	VEGF Konzentration	Abweichung
A	1 bis 4	4,2ng/ml	+/- 2,8ng/ml
B	5 bis 10	3,6ng/ml	+/- 2,4ng/ml
C	mehr als 10	3,7ng/ml	+/- 2,1ng/ml

Tab.3.12: Die VEGF-Konzentrationen in Follikelpunktaten nach Einordnung in verschiedene Gruppen nach Follikelanzahl. Die VEGFR-Konzentration wurde in einem immunologischen Test ELISA) (Duplikate) ermittelt. Die Abweichungen zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

3.5.3 Zusammenhänge der sVEGFR-1-Konzentration in den führenden Follikeln

In einem Ovar reifen stets mehrere Follikel während eines Zyklus nebeneinander heran. Dabei bildet sich ein führender Follikel heraus, der den größten Umfang annimmt. Die weiteren Follikel bleiben hinter dem führenden Follikel zurück, sind kleiner im Ausmaß oder können gegebenenfalls degradieren. Während einer Punktion der Follikel zur IVF wurde die Punktionsflüssigkeit der führenden Follikel des rechten und des linken Ovar getrennt voneinander gesammelt und anschließend auf ihren sVEGFR-1-Gehalt untersucht.

Die Konzentration des gesamten sVEGFR-1 in den Follikelflüssigkeiten lagen zwischen 0,5 ng/ml und 4,1 ng/ml sVEGFR-1 und die des freien löslichen Rezeptors knapp oberhalb der unteren Detektionslimits von 0,4 ng/ml. Die Konzentration des sVEGFR-1 in der Follikelflüssigkeit aus dem rechten Ovar einer Patientin variierte um etwa 0,5 bis

15 % von den Konzentrationen des linken Ovars. Die beiden führenden Follikel der 60 Patientinnen wiesen also eine nahezu gleiche Konzentration des löslichen Rezeptorproteins auf, die allerdings von Patientin zu Patientin zwischen 0,5 ng/ml und 4 ng/ml sVEGFR-1 schwankten (Abb.3.31).

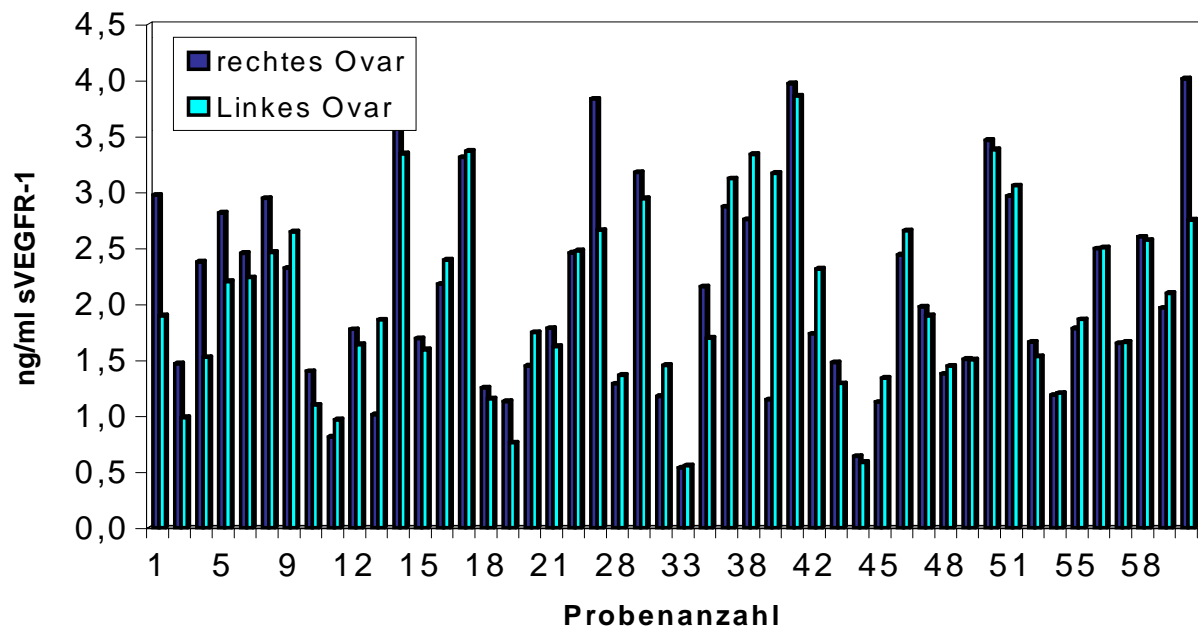


Abb.3.31: Die sVEGFR-1-Konzentration in Follikelflüssigkeiten der führenden Follikel nach Bestimmung der Gesamt-sVEGFR-1-Konzentration durch einen immunologischen Test (ELISA) in Duplikaten.

3.6 Untersuchungen zur Freisetzung des löslichen VEGFR-1

Mit Hilfe von Bindungsstudien auf HUVE-Zellen konnte die Bindungsrate von rekombinanten radioaktiv-markiertem ^{125}I -VEGF₁₆₅ auf Endothelzellen untersucht werden. Nach Subtraktion der unspezifischen Bindungen konnten die Bindungsaffinitäten zu den VEGF-Rezeptoren untersucht werden. Die direkt auf den Zellen verbleibende Radioaktivität wies auf eine Bindung der beiden transmembranen VEGF-Rezeptoren sowie der Neuropiline hin. Durch Kompetition mit unmarkiertem VEGF₁₆₅ konnte die Höhe der unspezifischen Bindung bestimmt werden, da die Rezeptorbindung des ^{125}I -VEGF₁₆₅ mit unmarkierten, im Überschuß zugesetzten VEGF verdrängt werden konnte. Durch

Kombination der Bindungsstudien mit ELISA-Messungen für das gesamte sVEGFR-1 konnte die Rezeptorausstattung der Zellen beobachtet werden.

In der Literatur wurde bis heute nur ein Weg zur Bildung der löslichen Rezeptorvariante sVEGFR-1 diskutiert: das alternative Spleißen des *flt-1*-Gens (Kendall und Thomas, 1993). Neuere Ergebnisse lassen darauf schließen, daß ein bestimmter Anteil des löslichen VEGFR-1 durch sogenanntes Shedding, proteolytisches Abspalten einer löslichen Rezeptorform vom membranständigen Rezeptor, gebildet wird (sVEGFR-1*). Typische Vertreter dieser proteolytisch aktiven Enzyme sind die Matrixmetalloproteinasen (MMP). Diese spielen eine Rolle bei der Angiogenese und werden von Endothelzellen exprimiert (Jackson und Nguyen, 1997; Chan et al., 1998). Um die Aktivität der MMPs zu inhibieren, kann der synthetische MMP-Inhibitor BB94 eingesetzt werden (Bramhall, 1997), der unter sich dem Namen Batimastat bereits in der Stufe I der klinischen Tests als Anti-Krebs-Mittel befindet (Beattie et al., 1998).

3.6.1 Bindungsstudien zur sVEGFR-1-Freisetzung auf HUVE-Zellen

HUVE-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche die VEGF-Rezeptoren-1 und -2 und Neurophiline. Mit Hilfe des Proteinkinase C (PKC) Aktivators PMA (Phorbol ester) kann die Expressionsrate des VEGFR-1 erhöht werden, die VEGFR-2-Expression bleibt unbeeinflußt (Barleon, 1994).

Die Bindungsexperimente wurden auf Zellen durchgeführt, die 24 Stunden zuvor unterschiedlich stimuliert wurden. Die Zellen zeigten eine um 21,1 % erhöhte Bindungsrate von ^{125}I -VEGF₁₆₅ nach der PMA-Stimulation, die auf Erhöhung der VEGFR-1-Anzahl -nicht aber der VEGFR-2- auf der Zelloberfläche beruht. Diese Bindungsrate ließ sich durch zusätzliche Stimulation der PMA-behandelten Zellen mit dem MMP-Inhibitor BB94 um 26 % steigern. Dies könnte auf eine Inhibition des Sheddings nach Zugabe von BB94 hinweisen. Die alleinige Zugabe von BB94 veränderte die Bindungsrate des ^{125}I -VEGF₁₆₅ auf den Endothelzellen nur sehr gering (weniger als 10 %) gegenüber den unbehandelten Zellen (Abb.3.32).

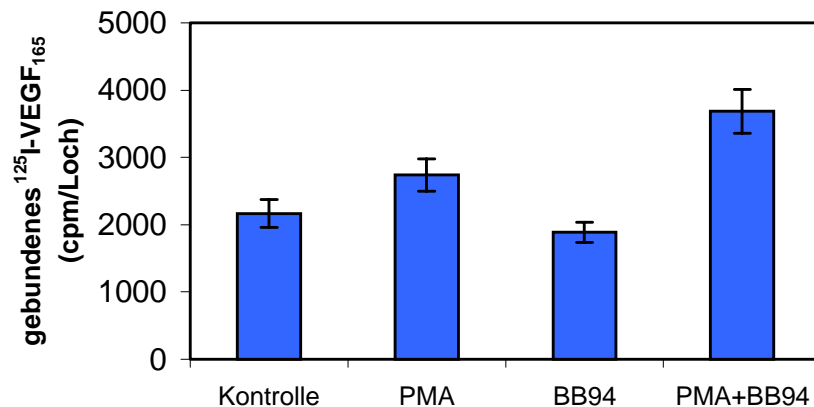


Abb. 3.32: Bindung von $^{125}\text{I-VEGF}_{165}$ auf HUVE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit PMA und dem MMP-Inhibitor BB94 (Duplikate). Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

Die Kontrollexperimente, in denen das radioaktiv-markierte $^{125}\text{I-VEGF}_{165}$ mit einem 100-fachen Überschuß an unmarkiertem VEGF_{165} kompetitiert wurde, ergaben eine unspezifische Bindung von 16% auf den Kontrollzellen und den PMA-stimulierten Zellen. Diese unspezifische Bindung ist unter anderem auf eine Anlagerung an der Plastikoberfläche oder der Matrix zurückzuführen (Abb.3.33).

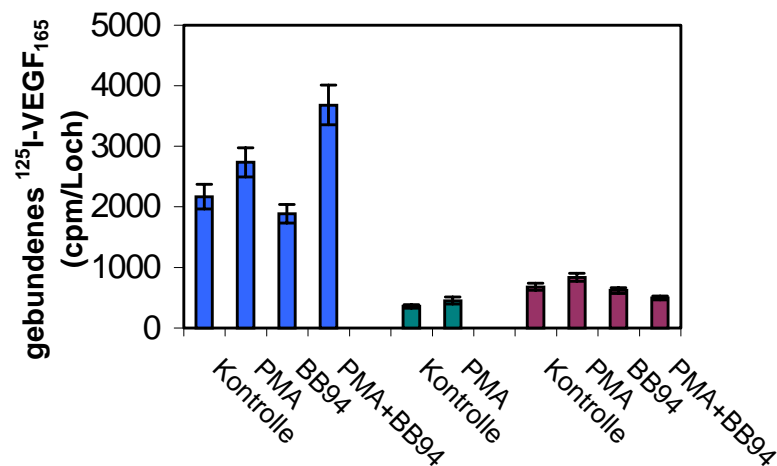


Abb.3.33: Bindung von $^{125}\text{I-VEGF}_{165}$ auf HUVE-Zellen. Neben Stimulation der Zellen mit PMA und BB94 und Bestimmung der $^{125}\text{I-VEGF}_{165}$ Bindung (blau) wurde die $^{125}\text{I-VEGF}_{165}$ Bindung mit unmarkiertem VEGF (grün) und PIGF-2 (rot) kompetitiert (Duplikate). Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

Weitere Kontrollexperimente wurden mit 1000-fachen Überschuß von PIGF-2 durchgeführt, das nur an VEGFR-1 bindet und so eine Aussage über die Bindungsrate von ^{125}I -VEGF₁₆₅ an VEGFR-2 ermöglicht. Diese Ergebnisse zeigten, daß zwischen 13 und 30 % der Bindung des ^{125}I -VEGF₁₆₅ an VEGFR-2 zurückging und diese nicht durch PMA oder BB94 beeinflusst wurde (Abb.3.33).

3.6.2 ELISA-Studien zur sVEGFR-1-Freisetzung auf HUVE-Zellen

HUVE-Zellen exprimieren neben den zwei transmembranen Rezeptoren auch einen löslichen VEGFR-1 (sVEGFR-1), der sich im Kulturmedium ansammelt. Der Kulturüberstand wurde auf den sVEGFR-1 Gehalt untersucht, so daß der Anteil des löslichen Rezeptorproteins direkt mit dem Bindungsverhalten der Zellen verglichen werden konnte.

Die sVEGFR-1-Konzentration in den PMA-stimulierten Zellüberständen lag 91 % höher als die der Kontrollüberstände, die in normalem Wachstumsmedium hergestellt wurden. Eine zusätzliche BB94-Stimulation bei PMA-behandelten Zellen bewirkte eine um 31 % geringere Freisetzung des sVEGFR-1 in den Kulturüberstand. Die alleinige Stimulation mit BB94 auf den HUVE-Zellen veränderte den Wert der sVEGFR-1-Konzentration nicht (Abb.3.34).

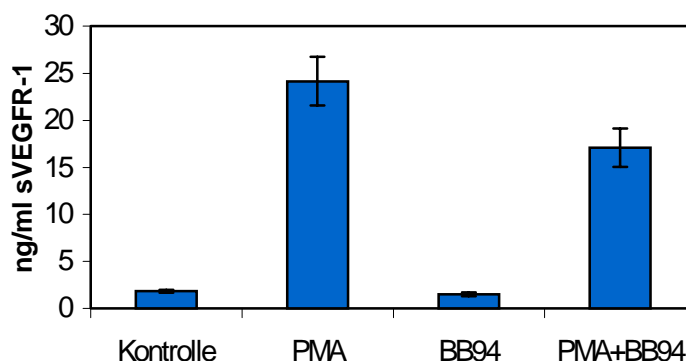


Abb. 3.34: Konzentration des Gesamt-sVEGFR-1 in Kulturüberständen von HUVE-Zellen nach Stimulation mit PMA und BB94. Nach Stimulation der HUVE-Zellen über 24 Stunden wurde ein immunologischer Test (ELISA) in Dublikaten durchgeführt. Die Balken zeigen die Schwankungen um den Mittelwert.

Die mit PMA und BB94 stimulierten Zellen gaben deutlich weniger des löslichen Rezeptorproteins in das Kulturmedium ab, verglichen mit der Konzentration der Kulturüberstände der PMA-stimulierten Zellen. BB94 als MMP-Inhibitor konnte wirksam einen Mechanismus zur Freisetzung des sVEGFR-1 unterdrücken.

4 Diskussion

4.1 Die Kultur humaner primärer Endothelzellen

Der Wachstumsfaktor VEGF gilt als einer der Hauptauslöser der Angiogenese. Seine Wirkung vermittelt er auf Endothelzellen, die nahezu ausschließlich die Rezeptoren-1 (VEGFR-1, FLT-1) und -2 (VEGFR-2, KDR) für VEGF tragen (Ferrara und Henzel, 1989; Terman et al., 1991; DeVries et al., 1992). Eine starke VEGF-Expression konnte in stark vaskularisierten Corpora lutea in humanen Ovarien nachgewiesen werden (Gordon et al., 1996). Auch Ferrara und seine Mitarbeiter (1998) zeigten im Rattenmodell, daß VEGF eine besonders wichtige Rolle während der Corpus luteum-Entwicklung spielt. Die Inhibition der VEGF-Aktivität durch rekombinantes, lösliches VEGFR-1 resultierte in einer Suppression der Corpus luteum-Angiogenese. VEGF und seine korrespondierenden Rezeptoren VEGFR-1 und -2 scheinen nicht nur in der pathologischen Tumorangio-genese (Kim et al., 1993), sondern auch in der physiologischen Vaskularisierung des Corpus luteums involviert zu sein.

Ein Zellkulturmodell mit Endothelzellen scheint zur Untersuchung der VEGF-Rezeptor-Regulation gut geeignet zu sein, denn diese Rezeptoren werden fast ausschließlich auf vaskulären Endothelzellen exprimiert. Die vorliegende Arbeit beruht auf einer Zellkulturtechnik von humanen primären Endothelzellen mit definierten Kulturbedingungen. Es wurde ein *in vivo* Modell mit Zellen humanen Ursprungs den bovinen oder murinen Zellen vorgezogen, da eine Kooperation mit Prof. Neulen aus Aachen bestand, die Möglichkeiten zur Verwendung humaner Zellen und Proben lieferte. Für weiterführende Studien mit humanen Granulosazellen würden sich Endothelzellen anderen Ursprungs nicht eignen, da schon die morphologische Analyse boviner und humaner Corpora lutea Unterschiede aufwies (Lei et al., 1991).

Es wurde nicht in Betracht gezogen, ein Zellkulturmodell mit Endothel-Zelllinien zu verwenden, denn diese können während der Kultivierung Endothelzell-spezifische Charakteristika verlieren (Ades et al., 1992). Es wurden größtenteils Endothelzellen untersucht, die aus einem Pool von mehreren Spendern bestanden. Ein einzelnes Ergebnis zeigte also stets eine Mischung aus Zellen von verschiedenen Spendern. Die humanen mikrovaskulären Endothelzellen wurden von CellSystems bezogen, die makrovaskulären HUVE-Zellen größtenteils selbst aus der Nabelschnurvene isoliert und anschließend kultiviert.

Die Verwendung der makrovaskulären Zellen in unterschiedlichen Experimenten hätte auch über die zehnte bis zwölfte Passage hinaus gehen können, wurde aber der Kultivierungsdauer der mikrovaskulären Zellen angepaßt. Diese zeigten ab der zwölften Passage keine einheitliche Morphologie mehr und wuchsen nicht mehr bis zur Konfluenz. Obwohl speziell für mikrovaskuläre Zellen entwickeltes Medium verwendet wurde, sind diese Zellen sehr viel anspruchsvoller als die makrovaskulären Zellen (Ades et al., 1992).

Generell zeigt das Arbeiten mit Primärzellen individuelle Schwankungen der exprimierten Rezeptorproteine. Dies mußte bei der Auswertung der einzelnen Zellkulturversuche beachtet werden. Die Betrachtung der absolut gemessenen Werte, die auf Zellmaterial von verschiedenen Spendern, unterschiedlichen Kombinerungspools der Zellen oder Patientinnen zurückgingen, konnte nur in Bezug auf eine Kontrolle miteinander verglichen werden. Die Untersuchungen zeigten in den meisten Fällen die gleichen relativen Ergebnisse.

Die HUVE-Zellen, die in unserem Labor aus Nabelschnurvenen isoliert wurden, wurden durch die positive Anfärbung mit dem Endothelzell-spezifischen Marker von-Willebrand-Faktor (Wagner et al., 1982) validiert. Ebenso wurde eine Kontaminierung durch beispielsweise Fibroblasten in allen Endothelzellen höherer Kultivierungspassage mittels von-Willebrand-Faktor-Färbung ausgeschlossen. Die Anzahl der positiv markierten Endothelzellen lag bei 70 bis 80 % der untersuchten Zellkulturen höherer Passage. Die kultivierten Endothelzellen zeigten die charakteristische Kopfsteinpflaster-Morphologie (Jaffe et al., 1972).

In Mitogenitätstests, die die Aufnahme radioaktiv-markierten Thymidins erfassen, konnten DNA-Synthese-steigernde Effekte mit bFGF sowie den Endothelzell-spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁ und PlGF-2 gezeigt werden. Alle drei Endothelzelltypen zeigen eine erhöhte DNA-Synthese nach Stimulation mit diesen Faktoren. Dabei zeigten sich unterschiedliche Reaktionen der Endothelzellen. HUVE-Zellen wurden mit bFGF etwa doppelt so stark angeregt wie mit den VEGF-Isoformen und PlGF. Die HDME-Zellen zeigten keine Reaktion auf eine Stimulation mit PlGF und die UtMVE-Zellen auf VEGF₁₂₁.

Die Stimulation der Endothelzellen mit bFGF zeigt, daß generell diese Zellen unter den gewählten Kulturbedingungen stimulierbar waren. Jedoch zeigten sie nicht nur auf bFGF eine uneinheitliche Reaktion, sondern auch auf VEGF.

bFGF sowie das verwandte aFGF sind keine ausschließlich auf Endothelzellen wirkenden Mitogene (Burgess et al., 1998; Basilico et al., 1992).

Die erhöhte DNA-Syntheserate nach Stimulation mit verschiedenen Isoformen des VEGF-A und PlGF weist darauf hin, daß die Endothelzellen den korrespondierenden und funktionellen Rezeptor exprimieren. Eine Reaktion auf VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ weist auf eine Expression von VEGFR-1 und -2 hin, die die Faktoren hochaffin binden, wobei nur die Bindung an VEGFR-2 einen mitogenen Effekt in der Zelle hervorruft (Waltenberger et al., 1994; Seetharam et al., 1995).

Die unterschiedlich erhöhte DNA-Synthese der Endothelzellen unter VEGF-A-Einfluß kann auf eine unterschiedliche Ausstattung an VEGF-Rezeptoren hinweisen. Die veränderte mitogene Reaktion der HUVE- und der UtMVE-Zellen nach PlGF-Stimulation ist interessant, denn bisher ist nur die Bindung an den VEGFR-1 bekannt (Maglione et al., 1991; Seetharam et al., 1995). Eine Ausbildung von VEGF/PlGF-Heterodimeren kann durch Bindung an VEGFR-2 mitogene Effekte auf Endothelzellen vermitteln, die allerdings geringer als die VEGF vermittelten Effekte ausfallen (Cao et al., 1996).

Nachdem die Kultivierung der verschiedenen Endothelzelltypen etabliert wurde, konnten die Zellen hinsichtlich ihrer VEGF-Rezeptorausstattung untersucht werden. Es mußte sichergestellt werden, daß die Endothelzellen unter den gewählten Kulturbedingungen die Rezeptorproteine für VEGFR-1 und -2 auch über mehrere Kultivierungspassagen und längere Kultivierungszeiten exprimieren. Allerdings konnte davon ausgegangen werden, daß die Endothelzellen funktionelle Rezeptoren aufweisen, da die Stimulation mit Endothelzell-spezifischen Wachstumsfaktoren eine positive Antwort zeigte. Bisher wurden in dieser Arbeit noch nicht auf den Nachweis der Gen- oder Protein-expressionsprodukte der VEGF-Rezeptoren eingegangen.

In Übereinstimmung mit Barleon et al. (1997b) wurden nach qualitativer Analyse der Genexpression mittels RT-PCR Transkripte von *flt-1* und *KDR* sowie der alternativ gespleißten Variante des *flt-1* für sVEGFR-1 in allen RNA-Isolaten der HUVE-, HDME- und der UtMVE-Zelleneine Genexpression nachgewiesen.

Die verwendeten Sequenzen für die Primerpaare für *flt-1*, die alternativ gespleißte Variante des *flt-1* für sVEGFR-1 und *KDR* wurden Publikationen entnommen oder im Falle von sVEGFR-1 anhand von Sequenzvergleichen ausgewählt. Die Unterscheidung der Primer für die transmembrane und die lösliche *flt-1*-Variante beruht auf der von Kendall und Thomas 1993 veröffentlichten Sequenz, in der die letzten 31 Aminosäuren des löslichen Proteins aus einem Intron kodiert werden. Dieses Intron ist in dem Transkript für

die transmembrane Variante nicht vorhanden. So war eine Unterscheidung der Transkripte möglich, und beide Transkripte wurden in jeder analysierten Endothelzell-RNA detektiert.

Mit Hilfe der *KDR*-Primer konnte ein cytoplasmatischer Teil des Rezeptortranskriptes amplifiziert werden. Es bestand keine Notwendigkeit zur Unterscheidung von transmembraner und löslicher Form, da für den VEGFR-2 keine natürlich vorkommende lösliche Variante beschrieben wurde. Auch wenn rekombinant eine lösliche Variante (sKDR) hergestellt werden konnte, hatte sie keinen deutlichen antagonistischen Einfluß auf VEGF-induzierte mitogene Reaktionen in Endothelzellen (Röckl et al., 1998). Eine wie für sVEGFR-1 beschriebene Funktion zur Bindung von VEGF, um seine Verfügbarkeit zu regulieren, ist für sKDR unwahrscheinlich. Die Affinität von sKDR zu VEGF ist nicht nur deutlich geringer als zu dem bereits beschriebenen sVEGFR-1 (Park et al., 1994), sondern es sind zusätzliche Hilfsproteine wie Proteoglykane zur Ligandenbindung notwendig (Röckl et al., 1998; Wiesmann et al., 1997).

Die Immunpräzipitation zum Nachweis des Rezeptorproteins für VEGFR-2 wurde mit einem Antikörper durchgeführt, der an die cytoplasmatische Region des Proteins bindet. Dieser Antikörper erkennt eine Doppelbande, deren Größe bei etwa 230 kDa und 200 kDa liegt. In allen untersuchten Endothelzell-Lysaten konnte diese Doppelbande nach Kultivierung der Zellen in Wachstumsmedium bis zur Subkonfluenz nachgewiesen werden. Die obere Bande war in allen Zellysaten die ausgeprägtere und zeigt das 230 kDa große und reife VEGFR-2-Protein nach der vollständigen Glykolysierung. Ebenfalls konnte das 200 kDa Protein nachgewiesen werden, das einen Zustand zwischen der glykolisierten und der unglykolisierten (150 kDa) Form zeigt (Shen et al., 1998). Nur das 230 kDa Protein ist in der Lage, eine Autophosphorylierung nach VEGF-Stimulation durchzuführen (Takahashi und Shibuya, 1997). Die untersuchten Endothelzellen exprimieren das reife Rezeptorprotein, zusätzlich konnte das unvollständig glykolisierte Protein nachgewiesen werden.

Da zum Nachweis des VEGFR-1 durch beispielsweise eine Immunpräzipitation kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand, wurde eine Quantifizierung von sVEGFR-1 in einem immunologischen Test (ELISA) durchgeführt. Barleon zeigte (1997b), daß in HUVE-Zellen sowohl die Transkripte für VEGFR-1 und sVEGFR-1 nach Stimulation mit VEGF in gleicher Weise ansteigen, so daß der Nachweis der löslichen Variante Rückschlüsse auf das transmembrane Rezeptorprotein zuläßt.

Es konnte in allen untersuchten Endothelzellen eine sVEGFR-1-Expression nachgewiesen werden.

4.2 Die Regulation der VEGF-Rezeptoren in humanen Endothelzellen

Das Ligand-Rezeptorsystem von VEGF und seinen Rezeptoren 1 und 2 ist ein feinreguliertes Gefüge, das über verschiedenen Ebenen reguliert werden kann. Ferrara et al. (1996b) haben gezeigt, daß schon die Veränderung der VEGF-Expression schon in heterozygoten Mäuseembryonen in einem letalen Phänotyp resultiert. Für die Ausbildung des kardiovaskulären Systems scheinen präzise VEGF-Konzentrationsgradienten eine Voraussetzung zu sein, die durch eine Verringerung der VEGF-Konzentrationen während der Embryonalentwicklung zu einer verminderten Angiogenese mit schweren Folgen führen.

Die Expression der VEGF-Rezeptoren 1 und 2, die fast ausschließlich auf das vaskuläre Endothel beschränkt ist, unterliegt ebenfalls einer Regulation. *In vivo* sind die Rezeptoren für VEGF in proliferierendem Endothel, zum Beispiel in einem Tumor, stark exprimiert. Die Endothelzellen jedoch im umliegenden gesunden Gewebe zeigen kaum eine VEGF-Rezeptor-Expression (Plate et al., 1992; Hatva et al., 1995). Auch *in vitro* unterliegen die Rezeptoren einer Regulation. Aber da die beiden untersuchten VEGF-Rezeptoren in Endothelzellen nicht einheitlich durch beispielsweise PMA stimuliert werden (Barleon, 1994), kann von unterschiedlichen Regulationsmechanismen der Rezeptoren ausgegangen werden.

Unter Zellkulturbedingungen zeigte sich eine erhöhte Rezeptor-Expression gegenüber frisch isolierten Zellen. In HUVE-Zellen wurde eine Zunahme der VEGFR-2-Expression um das 10-fache durch FACS-Analyse in frisch isolierten Zellen zu Zellen einer höheren Kultivierungspassage gezeigt (Böldicke et al., 2001). Ebenfalls konnte in RNA-Isolaten aus Nabelschnurvenen kaum eine Expression des *flt-1*- noch des *KDR*-Gens detektiert werden, eine Erhöhung der Transkripte um das 30-fache für beide Rezeptoren wurde allerdings in HUVE-Zellen höherer Passage nachgewiesen (Weich, unveröffentlicht). Diese Untersuchungen zeigen, daß schon eine Kultivierung der Endothelzellen ausreicht, um eine Regulation der Rezeptoren zu induzieren.

Barleon et al. zeigte (1997b), daß VEGF-haltige konditionierte Zellüberstände eine Zunahme der Gen- und Proteinexpression von VEGFR-1 in HUVE-Zellen bewirken, die nach Neutralisation mit einem VEGF-Antikörper nicht mehr nachzuweisen ist. Ebenso

wurde eine Hochregulation von *flt-1* in HUVE-Zellen gezeigt, nach dem diese mit VEGF₁₆₅ stimuliert wurden. Auch eine erhöhte sVEGFR-1-Sekretion nach VEGF₁₆₅-Stimulation konnte nachgewiesen werden (Hornig et al., 2000). VEGF kann auf Protein- und auf Genexpressionsebene eine Zunahme der VEGFR-1- und sVEGFR-1-Expression induzieren.

Anders verhält sich die *KDR*-Expression. Weder konditionierte Medien, die die *flt-1*-Expression beeinflussten, noch VEGF₁₆₅ bewirkten eine Veränderung der *KDR*-Expression auf HUVE-Zellen (Barleon et al., 1997b). In weiteren Versuchen konnten gegenteilige Aussagen gemacht werden. Wang et al. (2000) konnte in Endothelzellen zeigen, daß sowohl konditionierte Medien und auch VEGF eine Hochregulation des *KDR*-Gens zeigte. Ebenso wie Wang zeigten Kremer und Mitarbeiter (1997) eine Hochregulation von VEGFR-2 in einem murinen *in vitro* Modell, die durch Zugabe eines VEGF-neutralisierenden Antikörpers rückgängig gemacht werden konnte.

Eine Analyse der VEGF-Rezeptor-Regulation in Endothelzellkulturen ist ein kontrovers diskutierbarer Ansatz. Die Kultivierung der Zellen an sich scheint Effekte auf die Rezeptor-Expression auszuüben. Darüber hinaus werden verschiedene Ergebnisse in ähnlichen Versuchsansätzen erbracht. Eine Endothelzellkultur ist möglicherweise nicht das geeignete System zur Betrachtung der Rezeptor-Regulation, da die *in vitro* Bedingungen zu stark von den Bedingungen im Organismus abweichen. Es könnten Interaktionen mit Tumorzellen oder andere Zell-Zell-Kontakte nötig sein. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die Rezeptoren sich bereits auf einem hohem Expressionsstand befinden, so daß nur eine geringe oder keine Hochregulierung mehr möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden HUVE-Zellen unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und anschließend auf ihre VEGF-Rezeptor-Expression untersucht. Es wurde eine Zunahme der *flt-1*-Transkripte um das dreifache beobachtet, wenn die Zellen anstatt in Mangelmedium in Wachstumsmedium kultiviert wurden. Dabei unterschied sich die Höhe der Expression nur wenig in konfluenten oder subkonfluenten Zellen, in konfluenten Zellen konnte eine leicht erhöhte Expression nachgewiesen werden.

Auf Proteinebene wurde eine Zunahme der sVEGFR-1-Sekretion in Wachstumsmedium in HUVE- und in HDME-Zellen um das doppelte nachgewiesen, in UtMVE-Zellen um das 1,4-fache.

Die Zunahme der *flt-1*-Transkripte wird nicht so sehr durch den Kultivierungszustand der Zellen bestimmt, sondern vielmehr durch die Medienzusammensetzung. VEGF wie

auch bFGF wurden bereits beschrieben in ihrer Wirkung, die VEGFR-1 Expression zu erhöhen.

Die Expression des *KDR*-Gens unterschied sich unter den gleichen Wachstumsbedingungen von der Expression des *flt-1*-Gens. In subkonfluentem Zustand war die Expression in Wachstums- und in Mangelmedium gleich, in konfluenten Zellkulturen war in Mangelmedium sowie in Wachstumsmedium war eine deutliche Zunahme der Expression zu beobachten.

Das VEGFR-2-Protein wurde durch eine Immunpräzipitation nachgewiesen und zeigte in HUVE-, HDME und UtMVE-Zellen eine stärkere Expression in Wachstumsmedium als in Mangelmedium.

Im Gegensatz zu der Expression des *flt-1*-Gens wurde die *KDR*-Expression deutlich von der Zelldichte beeinflusst. In konfluentem Zustand war die Expression auf RNA-Ebene erhöht, wie es auch schon von Pepper und Mandriota (1998) in BME (bovinen mikrovaskulären Zellen) gezeigt wurde. In subkonfluenten Zellkulturen dagegen wurde eine geringe Expression gefunden. Die Expression des *KDR*-Gens spielt also eine Rolle nicht nur in proliferierenden Endothelzellen sondern, auch in den ruhenden Monolayer-Kulturen. Eine erhöhte *KDR*-Expression könnte nicht nur den proliferierenden Zelltyp im Tumoren begleiten, sondern auch in nicht mehr proliferierenden Zellkulturen zur Erhaltung der Endothelzellen nötig sein.

Das Wachstumsmedium scheint ebenfalls einen Effekt auf die Rezeptorexpression auszuüben. Da es neben weiteren Faktoren auch bFGF und VEGF enthält, ist eine Expressionserhöhung auf den Einfluß dieser Wachstumsfaktoren zurückzuführen.

Es konnte belegt werden, daß in Zellkulturen, die mit bFGF stimuliert wurden, eine Zunahme der *flt-1*-Transkripte und der sVEGFR-1-Sekretion zu beobachten war (Barleon, 1994; Hornig et al., 2000). Auch Pepper und Mandriota (1998) zeigten, daß auch ein Zusatz von bFGF im Kulturmedium eine Zunahme der *KDR*-Transkripte bedeutet.

4.3 Der *in vitro* Einfluß von humanen Granulosazellen auf Endothelzellen

Die Primärkultur humaner Granulosazellen ist ein interessantes Modell zur Untersuchung zellulärer Funktionen des jungen Corpus luteum. Die Granulosazellen eines heranreifenden Follikels spielen *in vivo* eine wichtige Rolle für die Entwicklung der

Oozyte. Nach der Ovulation ist die schnelle Ausbildung eines dichten Gefäßnetzes in der vormals avaskulären Schicht der Granulosazellen eine wichtige Voraussetzung für ein funktionelles Corpus luteum, das vorübergehend aktivste und am stärksten vaskularisierte Gewebe des menschlichen Körpers (Lei et al., 1991).

Ferrara zeigte 1998 im Modell hormonell stimulierter Ratten, daß die Inhibition der VEGF-Aktivität eine drastische Reduktion der Corpus luteum-Bildung zur Folge hat. Neben VEGF wurde auch bFGF als angiogen-aktiver Faktor in der Follikel- und der Corpus luteum-Entwicklung beschrieben, es wurde aber keine räumliche Korrelation zwischen bFGF-Expression und Proliferation gefunden, so wie sie für VEGF beschrieben wurde (Gospodarowicz et al., 1985; Yamamoto et al., 1997b; Reynolds et al., 1994). Die Entwicklung des Corpus luteum scheint dicht verknüpft mit einer VEGF-Expression und somit auch der Expression seiner Rezeptoren zu sein. Aber auch die Liganden Angiopoietin-1 und -2 des Tie-2-Rezeptors werden im Rattenovar in einer zyklischen Abhängigkeit exprimiert. Dies läßt Rückschlüsse auf eine unter anderem Tie-vermittelte Regulation der Corpus luteum-Gefäße zu (Maisonpierre et al., 1997).

Eine Kombination aus zwei verschiedenen Primärzelltypen in einem Kokulturmodell erschien reizvoll, um wertvolle Informationen zur Vaskularisierung des Corpus luteum zu erhalten. Auch wenn *in vivo* kein unmittelbarer Kontakt der Zellen zueinander besteht, war eine Kokultivierung der Zellen aussichtsreich, denn ohne eine starke Neovaskularisierung ist eine funktionelle Ausbildung des aus großen Teilen aus Granulosazellen bestehenden Corpus luteums nicht möglich (Lei et al., 1991).

Die Rezeptor-Expression der Endothelzellen sollte nun in Verbindung mit Granulosazellen oder deren Überständen analysiert werden. Grundsätzlich muß bei den Ergebnissen die Tatsache Beachtung finden, daß alle Untersuchungen mit Granulosazellen und Follikelflüssigkeiten von gesunden Frauen durchgeführt wurden, die sich einer Hormonbehandlung zur IVF unterzogen.

Die Ergebnisse zeigten keine Veränderung der Genexpression der VEGF-Rezeptoren, unabhängig von einer Kokultur oder der Zugabe von Granulosazell-Überständen. Dies könnte eine Folge einer schon unter normalen Kulturbedingungen hochregulierten Rezeptor-Expression sein (s. 3.2). Weiterhin könnten die von den Granulosazellen sekretierten Faktoren in zu geringen Konzentrationen vorliegen, oder unter den gewählten Kultivierungsbedingungen werden die Faktoren nicht entsprechend exprimiert.

Da die untersuchten Endothelzellen eine leichte Zunahme der *flt-1*-Transkripte sowie der sVEGFR-1 Sekretion unter VEGF-Einfluß zeigten, wurde unter Granulosazell-Einfluß ebenfalls eine Zunahme der VEGFR-1-Expression erwartet. Die Granulosazellen exprimieren nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* verschiedene Isoformen des VEGFs (Gordon et al., 1996; Laitinen et al., 1997). Auch ein Effekt auf die Gen- oder Proteinexpression des VEGFR-2 konnte weder unter VEGF-Einfluß noch unter Granulosazell-Einfluß beobachtet werden.

Gegen einen Effekt des von Granulosazellen sekretierten VEGFs spricht auch, daß die DNA-Synthese der Endothelzellen nicht durch die Granulosazell-Überstände beeinflusst werden konnte. In den verwendeten Granulosazell-Überständen wurde VEGF mittels ELISA von Frau Dr. Edda Wünsch aus Aachen nachgewiesen (Wünsch, 1999).

Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, das *in vivo* das von den Granulosazellen sekretierte VEGF eine Rolle in der Regulation der VEGF-Rezeptoren spielt. Ferrara zeigte 1998 in einem Rattenmodell mit hormonell induzierten Ovulation, das durch Inhibierung des VEGFs die Corpus luteum-Entwicklung fast nahezu unterbunden wird. VEGF wurde durch eine rekombinante, aus den Ig-Domänen 1 bis 3 bestehende sVEGFR-1-Variante gebunden und inaktiviert. Die daraus resultierende Reduktion der Angiogenese im Reproduktionssystem der Ratte zeigte sich durch stark verkleinerte Corpora lutea mit ischämischen Teilen, eine stark herabgesetzte Progesteronsekretion und einem unvollständigem Endometrium. Die Progesteronsynthese konnte nicht unbeeinflusst ablaufen, da zur Ausbildung eines funktionellen Corpus luteum seine starke Vaskularisierung notwendig ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine verminderte sVEGFR-1-Sekretion in allen untersuchten Endothelzelltypen unter Einfluß von Granulosazellen unter direkten und indirekten Kokulturbedingungen gefunden. Dabei zeigten die primären Granulosazellen einen ähnlichen Effekt wie die Granulosazelllinie, die als Ergänzung untersucht wurde. Der Mediator, der in dem Kulturüberstand der Granulosazellen vorkommt und ebenfalls diese Verringerung der Sekretion vermittelt, ist also löslich und verteilt sich frei im Kulturmedium. Die Verminderung der sVEGFR-1-Sekretion ließ sich auch durch die Zugabe von Granulosazell-Überständen zeigen.

Einen ähnlichen Effekt wie die kultivierten Granulosazellen, die *in vivo* den Follikel auskleiden und deren *in vitro* gewonnenen Überstände, vermittelte auch das Sterol FF-Mas (Meiosis activating sterol, extrahiert aus humanem preovulatorischen Follikelfluid) auf die sVEGFR-1-Sekretion der Endothelzellen. Dieses Sterol wurde aus

Follikelflüssigkeiten, die vor dem Zeitpunkt der Ovulation entnommen wurden, mittels HPLC extrahiert (Baltzen und Byskov, 1999). Es kann die Fortsetzung der Meiose in kultivierten murinen Oozyten initiieren, nachdem diese in Gegenwart eines natürlichen Meiose-Hemmers kultiviert wurden (Byskov et al, 1999). Als Bildungsort von FF-Mas werden die Cumuluszellen eines intakten Cumuluskomplexes beschrieben (Byskov et al, 1999). Allerdings ist noch nicht bekannt, ob kultivierte primäre Granulosazellen oder gar Granulosazelllinien dieses Sterol bilden können. Interessant ist, dass einerseits das FF-Mas und andererseits Kulturüberstände der *in vivo* FF-Mas produzierenden Zellen Granulosazellen des Cumuluskomplexes) eine Reduktion der sVEGFR-1-Sekretion von Endothelzellen hervorrufen.

Obwohl kein Einfluß der Granulosazellen auf die *flt-1* oder *KDR*-Expression gefunden wurde, nehmen die Granulosazellen Einfluß auf die VEGF-vermittelte Angiogenese. Durch die gleichzeitige Sekretion von VEGF und eines Mediators, der die Freisetzung von sVEGFR-1 verringert, kann die Verfügbarkeit des ungebundenen VEGFs erhöht werden. Den Endothelzellen wird mehr VEGF zur Verfügung gestellt, wenn weniger sVEGFR-1 vorhanden ist. sVEGFR-1 hat eine antagonistische Wirkung auf die transmembranen VEGF-Rezeptoren, denn indem es mit VEGF Komplexe bildet. Diese Komplexe können einerseits als Heterodimere aus einem transmembranen Rezeptor und einem löslichen Rezeptor gebildet werden, denen die Fähigkeit zur Autophosphorylierung fehlt, oder auch als Homodimere aus löslichen Rezeptoren das aktive VEGF ummanteln und den transmembranen Rezeptoren unzugänglich machen (Hornig und Weich, 1999).

4.4 Untersuchungen von Realproben aus dem Ovar

In humanen Follikelflüssigkeiten, die bei der Oozytengewinnung zur IVF anfallen, konnte das lösliche Rezeptorprotein sVEGFR-1 nachgewiesen werden. Dies wurde durch Verwendung eines immunologischen Tests (ELISA) gezeigt, der sowohl Liganden-gebundenes als auch freies und unkomplexiertes Protein nachweist (Hornig et al., 1999). Es wurde sVEGFR-1-Konzentrationen des Gesamtproteins zwischen 1,1 ng/ml und 4,2 ng/ml nachgewiesen. Eine Detektion des unkomplexiert vorliegenden sVEGFR-1 konnte nur in wenigen Fällen gezeigt werden, der größte Teil der komplexen Proben zeigte ein negatives Testresultat. Der sVEGFR-1 liegt in den unverdünnten

Follikelflüssigkeiten in nahezu vollständig komplexiertem Zustand vor, die Bindungstellen des Rezeptorproteins sind mit einem Liganden blockiert. Als Liganden für sVEGFR-1 wurde neben VEGF-A, dessen Vorkommen in Follikelflüssigkeit bekannt ist (Neulen et al., 1998), auch PIGF beschrieben (Hornig et al., 2000). Da Granulosazellen, die die Follikelflüssigkeit direkt umgeben, VEGF-A exprimieren (Yan et al., 1993), kann PIGF als Ligand zur Komplexbildung ausgeschlossen werden. Eine Expression von PIGF in Granulosazellen wurde bisher nicht beschrieben.

In allen zur sVEGFR-1-Bestimmung eingesetzten Proben wurde von Frau Dr. Edda Wünsch aus Aachen VEGF nachgewiesen. Die VEGF-Konzentration der Follikelflüssigkeiten lag zwischen 3,6 und 4,2 ng/ml. Der verwendete Test ist ein Nachweissystem für alle VEGF-A Isoformen, die sekretiert werden (R&D Systems, Wiesbaden). In kultivierten Granulosazellen werden VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ sowie VEGF-B und VEGF-C exprimiert (Laitinen et al., 1997). *In vivo* könnten also die Liganden des löslichen Rezeptorproteins sVEGFR-1 die Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ und VEGF₁₆₅ sowie möglicherweise VEGF-B sein. VEGF₁₄₅ wird besonders im weiblichen Reproduktionssystem exprimiert (Charnok-Jones et al., 1993). VEGF-C wird von den Granulosazellen gebildet, aber es scheidet als Ligand für sVEGFR-1 aus, denn es wurde nur eine Affinität zu VEGFR-2 und -3 beobachtet (Joukov et al., 1996).

Obwohl Otani und seine Mitarbeiter 1999 eine VEGFR-1-Expression durch eine immuno-histologische Färbung in Granulosazellen zeigten, konnte in der vorliegenden Arbeit in Überständen kultivierten Granulosazellen kein sVEGFR-1 detektiert werden.

Obwohl die Theka interna stark vaskularisiert ist und mikrovaskuläre Endothelzellen einen sVEGFR-1-Syntheseort darstellen, konnte dort keine VEGFR-1 als Protein oder Transkript nachgewiesen werden (Yan et al., 1998). Das unmittelbar an die Granulosazellen angrenzende Endothel hätte eine sVEGFR-1-Ressource für die Follikelflüssigkeit darstellen können, wenn der lösliche Rezeptor die Basalmembran passieren könnte (Rodgers et al., 2000).

Die ermittelten Ergebnisse der VEGF- und sVEGFR-1-Messungen in den Follikelflüssigkeiten wurden miteinander in Korrelation gebracht, je nach Follikelanzahl der einzelnen Patientin. Die Patientinnen unterzogen sich einer Gonadotropin-Therapie zur IVF wegen unterschiedlicher Fertilitätsprobleme. Dabei wurde erstmals ein negativer Zusammenhang zwischen der Menge an sVEGFR-1 und der Stimulierbarkeit der Patientin, die sich durch die Anzahl der Follikel auszeichnet, gefunden. Die Follikelflüssigkeiten der Patientinnen mit wenigen Follikeln (bis 4) wiesen eine

sVEGFR-1-Konzentration von durchschnittlich 4,2 ng/ml auf. Die sVEGFR-1-Konzentrationen bei Frauen mit durchschnittlicher Follikelanzahl (5 bis 10) lag bei 2,1 ng/ml und bei Frauen mit hoher Follikelanzahl bei 1,1 ng/ml. Anders formuliert bedeutet es einen positiven Zusammenhang von unkomplexiert vorliegendem VEGF zu der Oozytenreifung in Ovar (Neulen et al., 2001).

VEGF und der Antagonist sVEGFR-1 unterliegen einer Regulation durch Hypoxie, die eine erhöhte Expression der Gene verursacht (Gerber et al., 1997; Shweiki et al., 1992). Die sich entwickelnde Oozyte ist ebenfalls ein empfindliches System gegenüber Sauerstoffmangel (van Blerkom et al., 1997). Obwohl die Hypothese kontrovers diskutiert werden kann, wird angenommen, daß hohe VEGF-Konzentrationen auf eine herabgesetzte Oozytenqualität und somit auf geringere Fertilisationsraten hindeuten (Barroso et al., 1999).

Im Ovar bilden sich als Resultat auf eine Gonadotropingabe Eizellen aus, deren Anzahl deutlich geringer ist, wenn wenig verfügbares VEGF in der Follikelflüssigkeit vorhanden ist. VEGF kann durch Komplexierung mit seinem Antagonisten sVEGFR-1 nicht mehr frei und verfügbar vorliegen. Eine vermehrte Bildung des Antagonisten in den ovariellen Blutgefäßen kann damit die Reduzierung der VEGF-Verfügbarkeit und die daraus resultierende Fertilitätsminderung bedeuten. Allerdings ist ein ausgewogenes Gleichgewicht zur optimalen Follikel- und somit Oozytenentwicklung nötig, denn ein Überschuß an freiem VEGF erhöht die Wahrscheinlichkeiten einer OHSS-Erkrankung und der Überschuß an sVEGFR-1 reduziert eventuell die Fertilität einer Patientin.

4.5 Untersuchungen zur Freisetzung des löslichen sVEGFR-1

Sowohl mikro- als auch makrovaskuläre Endothelzellen generieren einen löslichen VEGF-Rezeptor, sVEGFR-1, der bis auf einen kurzen Aminosäurerest am C-Terminus den sechs extraplasmatischen Domänen des VEGFR-1 entspricht (Kendall et al., 1993). Diese Rezeptorvariante konnte nicht nur in Zellkulturüberständen (Kendall et al., 1993) sondern auch *in vivo*, beispielsweise in Amnionflüssigkeiten, nachgewiesen werden (Banks et al., 1998; Hornig et al., 1999). Obwohl Kendall und Thomas zeigten, daß die lösliche Variante durch alternatives Spleißen aus der mRNA des transmembranen Rezeptors entsteht, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß auch proteolytisches

Abspalten („Shedding“) der sechs extraplasmatischen Domänen des transmembranen VEGFR-1 eine Möglichkeit zur Freisetzung ist.

Beide Mechanismen zur Bildung eines löslichen Rezeptorproteins wurden bisher für Tyrosin-Kinase-Rezeptoren beschrieben. Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) wird als verkürzte Form durch alternatives Spleißen vom Primärtranskript generiert und wurde in Überständen von Rattenzellkulturen nachgewiesen (Downing et al., 1989). Der Tyrosin-Kinase-Rezeptor Axl wird durch proteolytisches Abspalten der extrazellulären Region von der Kinaseregion getrennt, wobei bisher keine involvierte Protease identifiziert wurde (O'Bryan et al., 1995).

Auch die beiden Endothelzell-spezifischen Rezeptor Tyrosin-Kinasen Tie-1 und Tie-2 werden durch proteolytische Aktivität von dem membranständigen Rezeptorprotein abgespalten (Yabkowitz et al., 1997). Die Identifizierung dieses Mechanismus und seiner daran beteiligten Faktoren wurde mit Hilfe der Metalloprotease-Inhibitoren wie BB24 durchgeführt (Yabkowitz et al., 1999). Die Stimulation mit beispielsweise PMA oder VEGF kann die Freisetzung des löslichen Tie-Rezeptors positiv beeinflussen. Mittels ELISA konnte die Zunahme des löslichen Tie-1 in Zellkulturüberständen ermittelt werden, wobei eine zusätzliche Inkubation mit BB24 die Freisetzung inhibiert. Die Aktivität der Protease, die die lösliche Tie-1 Variante abspaltet, ist unter Einfluß von Serin-, Cystein- oder weiteren Metalloprotease-Inhibitoren nicht verändert (Yabkowitz et al., 1997). Die Tie-1 Protease ist bisher noch nicht identifiziert. Eine Inhibition durch EGTA könnte auf eine Ca^{2+} -abhängige Protease hindeuten (Yabkowitz et al., 1997).

In Falle des sVEGFR-1 freigesetzt von Endothelzellen scheint aus alternativem Spleißen und proteolytischem Freisetzen des löslichen Rezeptors eine Möglichkeit der Synthese darzustellen. Durch Verknüpfung von Bindungsstudien mit radioaktiv-markiertem VEGF und Messungen des löslichen Rezeptorproteins mit einem immunologischen Test (ELISA) wurde erstmals folgendes gezeigt: HUVE-Zellen zeigen nach Stimulation mit PMA eine um 21 % erhöhte spezifische VEGF-Bindung auf ihrer Oberfläche und sekretieren 91 % mehr sVEGFR-1 in den Kulturüberstand. Nach Zugabe des MMP-Inhibitors BB94 zu den PMA-stimulierten HUVE-Zellen steigt die spezifische VEGF-Bindung auf der Zelloberfläche um weitere 26 % an, die Sekretion des Proteins allerdings wird um 31 % gegenüber der PMA-Stimulation verringert.

Die Zunahme der Transkripte des *flt-1*-Gens nach PMA-Stimulation wird durch Protein-kinase C (PKC) Aktivierung erreicht und resultiert ebenfalls in einer Erhöhung Transkripte für die transmembranen und löslichen Rezeptoren, ohne eine Steigerung der

KDR-Expression (Barleon, 1994). Die vermehrte Bindung des VEGFs auf Endothelzellen unter PMA-Einfluß geht auf eine veränderte Proteinexpression zurück, die durch Zunahme des sVEGFR-1 im Kulturüberstand gezeigt wurde (Hornig et al., 2000). Für die PMA-Stimulation wurde bisher eine gleichmäßige Erhöhung der transmembranen und löslichen *flt-1*-Transkripte gezeigt (Barleon, 1994).

Die Sekretion des sVEGFR-1 wird unter PMA-Einfluß erhöht, allerdings zeigt sich nach Zugabe von dem Metalloprotease-Inhibitor BB94 eine Verminderung der sVEGFR-1-Sekretion auf den Endothelzellen.

Sowohl BB94 wie auch BB24 aus der Familie der synthetischen Hydroxamate werden als Inhibitor für MMPs beschrieben, in dem es das Zinkion am aktiven Teil der MMPs bindet (Wojtowicz-Praga et al., 1996). Eine Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-14 in Endothelzellen ist bekannt (Haas et al., 1998; Nguyen et al., 2000). MMP-2 beispielsweise wirkt auf die extrazelluläre Matrix und degradiert dort Kollagenasen (Sato et al., 1994). MMP-14 wird auf der Oberfläche von Endothelzellen als latente Form exprimiert und nach Abspaltung durch Membran-assoziierte MMPs (MT-MMP) aktiviert. Durch diese Degenerierung der Kollagenasen der Basalmembran können die Endothelzellen in das Stroma des umliegenden Gewebes einwachsen (Nguyen et al., 2000).

In einer Zellkultur könnte nach Zugabe von BB94 die Aktivität der MMPs gehemmt sein, die das lösliche Rezeptorprotein von der Zelloberfläche lösen.

Abschließend sind verschiedene Modelle zur Freisetzung des sVEGFR-1-Proteins denkbar.

- (1) Das alternative Spleißen des Transkriptes von *flt-1* wurde von Kendall et al. 1996 nachgewiesen. Es resultiert in einer aus 6 Ig-Domänen bestehenden Form, die in Überständen von Endothelzellen als löslicher Rezeptor nachgewiesen wurde. Dieses sVEGFR-1-Protein besitzt allerdings ein 31 Aminosäure-langes C-terminales Ende, das in der transmembranen Variante nicht vorkommt. Diese 31 Aminosäuren werden von einer Intronstruktur translatiert, die in dem transmembranen Protein nicht vorhanden ist (Kendall et al., 1996). Die Funktion dieses C-Terminus ist bisher unbekannt. Neben den Ergebnissen von Barleon et al. (1997), der eine gleichmäßige Expression der löslichen und der transmembranen Transkripte zeigte, liegen auch Ergebnisse zu einer Expression vor, die entweder die löslichen oder die transmembranen Transkripte erhöht (He et al., 1999).

- (2) Das proteolytische Abspalten der löslichen Rezeptorvariante durch Aktivierung MMPs, wie es für den Tie-1-Rezeptor beschrieben wurde (Yabkowitz et al., 1997), könnte eine Möglichkeit der Freisetzung des sVEGFR-1 darstellen. Dieses lösliche Protein würde, da es von dem gleichen Primärtranskript wie der transmembrane Rezeptor generiert wird, keinen eigenen C-terminus aus 31 Aminosäuren erhalten. Dieses Modell wurde in Insektenzellkulturen beobachtet. In Überständen von Insektenzellen, die im Baculo-Virus-System nur die kodierende Sequenz der transmembranen Variante exprimierten, konnte lösliche Rezeptorproteine nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von P. Carmeliet).
- (3) Als weiteres Modell würde eine Kombination aus (1) und (2) möglich sein. Die über alternatives Spleißen generierten sVEGFR-1-Proteine würden sich nicht augenblicklich von der Zelloberfläche lösen, sondern in einem gewissen Maße an der extrazellulären Matrix gebunden bleiben. Mit Hilfe der in Endothelzellen exprimierten und aktivierten MMPs könnte eine darauffolgende proteolytische Ablösung der löslichen Proteine erreicht werden. Möglicherweise ist dies eine Funktion des spezifischen C-Terminus des sVEGFR-1.

Durch Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit und der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. H. Weich erscheint das dritte Modell am wahrscheinlichsten. Hornig et al. (2000) zeigte das in verschiedenen Zellkulturen nur eine Variante des sVEGFR-1 vorlag. Die Expressionstudien des *flt-1*-Gens zeigten ebenfalls eine gleichmäßige Erhöhung der Transkripte für die transmembrane und lösliche Rezeptorform. Diese Voraussetzungen deuten also auf eine Kombination aus alternativem Spleißen des *flt-1*-Transkriptes sowie eine proteolytische Lösung der sVEGFR-1-Proteine von der extrazellulären Matrix.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßte sich mit der Fragestellung zur Regulation der Angiogenese im Corpus Luteum. Dies ist einer der wenigen Vorgänge mit physiologischer Angiogenese im adulten Körper.

Mikro- und makrovaskulären Endothelzellen sind wichtige Zielzellen für den Wachstumsfaktor VEGF. Neben Monozyten, hämatopoetischen Zellen und wenigen weiteren Ausnahmen kommen die spezifischen Rezeptoren für VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR), auf vaskulärem Endothel vor.

Es wurde die Rezeptorausstattung der Endothelzellen untersucht, um zu überprüfen, welche der Rezeptoren in dem verwendeten *in vitro* System exprimiert wurden. Alle drei untersuchten Endothelzelltypen zeigten eine Expression der Gene für *KDR* und die transmembrane und die lösliche Form des *flt-1*. Auf Proteinebene konnte die lösliche VEGFR-1-Variante sowie das VEGFR-2-Protein nachgewiesen werden. Durch Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen konnte gezeigt werden, daß die Rezeptoren unterschiedlich auf verschiedene Medienzusammensetzungen und stimulierende Faktoren reagieren.

Um spezieller auf die Fragestellung des Corpus luteums im Ovar einzugehen, wurde ein Kokultur-Modell mit Granulosazellen entwickelt. Diese Zellen wurden, in Kooperation mit Herrn Prof. Neulen an der RWTH Aachen, aus Follikelpunktionsflüssigkeiten zur Oozytengewinnung für die In Vitro Fertilisation (IVF) isoliert. Die primären Endothelzellen wurden nun hinsichtlich der VEGF-Rezeptor-Regulation untersucht, nachdem sie in direktem oder indirektem Kontakt mit humanen primären Granulosazellen kultiviert wurden. Diese Kultivierungsbedingungen zeigten keine Veränderung der VEGF-Rezeptor-Expression auf RNA-Ebene und keinen Effekt auf die Expression des VEGFR-2-Proteins. Sowohl in den makro- als auch in den mikrovaskulären Endothelzellen wurde mit Hilfe eines immunologischen Tests (ELISA) eine Reduzierung der sVEGFR-1-Sekretion im Kulturüberstand beobachtet.

Der Effekt auf die sVEGFR-1-Sekretion konnte auch durch Zugabe von Granulosazell-Kulturüberstand induziert werden, selbst wenn der GC-Überstand verschiedenen Modifikationen unterzogen wurde.

Abschließend wurde die Hypothese aufgestellt, daß eine Granulosazell-induzierte Herunterregulation der sVEGFR-1-Sekretion durch Endothelzellen eine höhere Verfügbarkeit des von den Granulosazellen sekretierten VEGFs bedeutet und somit die biologische Aktivität erhöht. Dies wäre eine Erklärung für die starke Vaskularisierung während der Corpus luteum-Entwicklung, wie sie nur im Ovar beobachtet werden kann.

6 Literatur

- Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA (1998) Vascular endothelial growth factor-D is a ligand for the tyrosine kinases VEGFR-2 and VEGFR-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:548-553
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ (1992) HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *Society Invest Dermat* 22:683-690
- Ausprunk DH, Folkman J (1977) Migration and proliferation in endothelial cells in perfused and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvas Res* 14:53-65
- Baltsen M, Bykov AG (1999) Quantification of meiosis activating sterols in human follicular fluid using HPLC and photodiode array detection. *Biomed Chromatogr* 13:382-388
- Banks RE et al. (1998) Evidence of the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor, Flt-1. *Mol Hum Reprod* 4:377-386
- Barleon B (1994) Dissertation: Molekulare und zelluläre Charakterisierung der VEGF-Rezeptoren flt-1 und KDR: Differentielle Regulation der Genexpression.
- Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G (1997a) Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial cell growth factor receptor Flt-1. *J Biol Chem* 272:10382-10388
- Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, Weindel K, Herzog C, Marme D (1997b) Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (Flt-1) and a soluble variant of Flt-1 in human endothelial cells. *Cancer Res* 7:5421-5424
- Barroso G, et al. (1999) Vascular endothelial growth factor, nitric oxide, and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril* 72:1024-1026
- Basilico C, Moscatelli D (1992) The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 59:115-165
- Beattie GJ, Smyth JF (1998) Phase I study of intraperitoneal metalloproteinase inhibitor BB94 in patients with malignant ascites. *Clin Cancer Res* 4:1899-1902
- Berse B, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR (1992) Vascular permeability factor (Vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors. *Mol Biol Cell* 3: 211-220
- Boock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Varker PJ, Wright KA, Twentyman PR, Smith SK (1995) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt-1 and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87:506-516
- Böldicke T, Tesar M, Griesel C, Rohde M, Gröne HJ, Waltenberger J, Kollet o, Lapidot T, Yaron A, Weich HA (2000) Anti-VEGFR-2 scFvs for Cell Isolation. Single Chain Antibodies Recognizing the Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2/flk-2) on the Surface of Primary Endothelial Cells and Preselected CD34⁺ Cells from Cord Blood. *Stem Cells* 19:24-36
- Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR (1997) Imbalance of the Expression of MMPs and tissue inhibitors of the matrix TIMPs in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 182:347-355
- Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR, Dvorak HF, Rosen S (1992) Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int* 42: 1457-1461

- Burgess WH, Maciag T (1998) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58:575-606
- Bussolino F, Mantovani A, Persico G (1997) Molecular mechanisms of blood vessel formation. *TIBS* 22: 251-256
- Byskov AG, Andersen CY, Leonardsen L, Baltzen M (1999) Meiosis activating sterols (MAS) and fertility in mammal and man. *J Exp Zool* 285:237-242
- Cao Y et al. (1996) Heterodimers of Placenta Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor. *J Biol Chem* 271:3154-3162
- Cao Y, Yi WR, Qi P, Rosin A, Cao Y (1997) Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Com* 235:493-498
- Carr BR, Sadler RK, Rochelle DB, Stalmach MA, MacDonald PC, Simpson ER, (1981) Plasma lipoprotein regulation of progesterone biosynthesis by human corpus luteum tissue in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 52:875-881
- Chan AS, Leung SY, Wong MP, Yuen ST, Cheung N, Fan YW, Chung LP (1998) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression astrocytoma, oligodendroglioma and ependymoma. *Am J Surg Pathol* 22:816-826
- Channing CP (1970) Influences of the in vivo and in vitro hormonal environment upon lutenization of granulosa cells in tissue culture. *Recent Prog Horm Res* 26:589-622
- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK (1993) Identification and localization of alternatively spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial cell lines. *Biol Reprod* 48:1120-1128
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Claesson-Welsh L (1999) Vascular growth factors and angiogenesis. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Clauss M, Weich HA, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J, Risau W (1996) The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. *J Biol Chem* 271:17629-17634
- Clauss M (1998) Functions of the VEGF receptor-1 (Flt-1) in the vasculature. *TCM* 8:241-245
- Connolly DT, Olander JV, Heuvelman DM, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore N, Leimgruber R, Feger J (1989) Tumor vascular permeability factor: Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 265: 20017-20024
- Detmer M, Brown LF, Berse BF, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP (1997) Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 108:263-26
- De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255:989-991
- DiPietro LA (1997) Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. In: Rosen E, Goldberg I (eds) *Regulation of angiogenesis*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 295-315
- Dougher-Vermazen M, Hulmes JD, Bohlen P, Terman BI (1994) Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 728-738

- Eichmann A, Marecille C, Breant C, Le Douarin NM (1993) Two molecules related to the VEGF receptor are expressed in early endothelial cells during avian embryonic development. *Mech Dev* 42:33-48
- Ferrara N, Henzel WJ (1989) The pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858
- Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor of polypeptides. *J Cell Biochem* 47:211-218
- Ferrara N (1996a) Vascular endothelial growth factor. *Europ J Cancer* 32A:2413-2422
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996b) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-342
- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber H-P, Nguyen T-N, Peers D, Christolm V, Hillan KJ, Schwall RH (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine* 4:336-340
- Folkman J, Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934
- Fong GH, Rossant J, Gertenstein M, Breitman ML (1995) Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376:66-70
- Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE, Klagsburn M (1995) Peripheral blood T lymphocytes infiltrating human cancer express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 55: 4140-4145
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HAT, Meny MG, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP (1996) Production of vascular endothelial growth factor by human tumor inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2:1096-1103
- Gerber HP, Conorelli F, Park J, Ferrara N (1997) Differential transcriptional regulation of the two VEGF receptor genes. Flt-1, but not KDR/Flk-1, is upregulated by hypoxia. *J Biol Chem* 272:23659-23667
- Gitay-Goren H, Cohen T, Tessler S, Soker S, Gengrinovitch S, Rockwell P, Klagsburn M, Levi B, Neufeld G (1996) Selective binding of VEGF₁₂₁ to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271:5519-5523
- God D, Polverini P, Rastinejad F, Beau M, Lemons R, Frazier W, Bouck N (1991) A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6624:6628
- Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB (1996) Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *J Clin Endocrinol Metab* 81:353-359
- Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Bohlen P (1985) Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* 117:2283-2292
- Gospodarowicz D, Abraham JA, Shilling J (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7311-7315
- Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J (1993) Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 69:509-516

- Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB (1995) Vascular endothelial growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contains SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 270:6729-6733
- Haas T, Davis SJ, Madri JA (1998) Three-dimensional Type-I Collagen Lattices Induce Coordinate Expression of Matrix Metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in Microvascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* 273:3604-3610
- Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277:48-50
- Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364
- Harada S, Rodan S, Rodan GA (1995) Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *Clin Ortho* 313: 76-80
- Hata Y, Duh E, Zhang K, Robinson GS, Aiello LP (1998) Transcription factors SP1 and SP3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem* 273:19294-19303
- Hatva E, Kaipainen A, Mentule P, Haltia M, Alitalo K (1995) Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinase and growth factors in human brain tumors. *Am J Pathol* 146:368-378
- He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS (1999) Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) is important for the regulation of VEGF activity
- Hewett PW, Murray JC (1996) Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells. *221:697-702*
- Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9349-9354
- Hofbauer LC, Hicok KC, Khosla S (1998) Effect of gonadal and adrenal androgens in a novel androgen-responsive human osteoblastic cell line. *J Cell Biochem* 71:96-108
- Hornig C, Behn T, Bartsch W, Yayon A, Weich HA (1999) Detection and quantification of free and complexed soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immunol Meth* 226:169-177
- Hornig C, Weich HA (1999) Soluble VEGFR-1 receptors. Recombinant and naturally occurring forms involved in the regulation of angiogenesis. *Angiogenesis* 3:33-39
- Hornig C, Barleon B, Ahmed A, Vuroela P, Ahmed S, Weich HA (2000) Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Lab Invest* 80:443-454
- Hosokawa K, Aharoni D, Dantes A, Shaulian E, Schere-Levi C, Atzmon R, Kotsuji F, Oren M, Vlodavsky I, Amsterdam A (1998) Induction of Ad4BP/SF-1, StAR and cytochrome P450scc enzyme system in newly established human granulosa cell line. *Endocrinol* 139(11):4679-4687
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267:26031-26037
- Hunter W, Greenwood FC (1962) Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-496
- Ikeda T, Wakiya K, Shibuya M (1996) Characterization of the promoter region of the flt-1 tyrosine kinase gene, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Growth Factors* 13:151-162

- Illi B, Puri P, Morgante L, Capogrossi M, Gaetano C (2000) Nuklear factor κ B and cAMP responsive element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the flk-1/KDR gene promoter. *Circ Res* 86:110-117
- Ito H, Wernstedt C, Engström U, Claesson-Welsh L (1998) Identification of VEGFR-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem* 273:23410-23418
- Jackson CJ, Nguyen M (1997) Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of MMPs. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1167-1177
- Jaffe EA, Nachmann RL, Becker CG (1972) Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins. *J Clin Invest* 51:46a
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:17771-17778
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lathinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1996) A novel endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) tyrosine kinases. *EMBO J* 15:290-298
- Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch MM, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1997) Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 16:3898-3911
- Junqueira LC et al. (1995) *Basic Histology*, Appleton & Lange
- Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF (1995) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol* 146:157-165
- Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by an endogenous encoded soluble receptor. *Proc natl Acad Sci USA* 90:10705-10709
- Kendall RL, Wang G, Thomas KA (1993) Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 226:324-328
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature* 362:841-844
- Klekamp JC, Jarzecka K, Perkett EA (1999) Exposure to hypoxia decreases the expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in adult rat lung. *Am J Pathol* 154:823-831
- Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH (1997) Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor - 2/flk-1 by its Ligand in a Cerebral Slice Culture System. *Cancer Res* 57:3852-3859
- Laitinen M, Ristimäki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O (1997) Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid level in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 138:4748-4759
- Lei ZM, Chegini N, Rao CV (1991) Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol Reprod* 44:1148-1156
- Lytle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ (1994) Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 68:84-92
- Maglione D, Guerreiro V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc natl Acad Sci USA* 88:9267-9271

- Maisonpierre PC, et al. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55-60
- Mandriota S, Menoud PA, Pepper MS (1996) Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271:11500-11505
- Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W (2000) Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 156:965-976
- McClure N, Macpherson AM, Healy DL, Wreford N, Rogers PAW (1994) An immunohistochemical study of the vascularization of the human graaf follicle. *Hum Reprod* 9:1401-1405
- Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehio C (1999) A novel vascular endothelial growth factor encoded by orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 but not VEGFR-1 receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 18:363-374
- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NPH, Risau W, Ullrich A (1993) High Affinity VEGF binding and developmental expression suggest flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72:835-846
- Morishita K, Johnson DE, Williams LT (1995) A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial specific gene expression. *J Biol Chem* 270:27948-27953
- Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, Marme D, Breckwoldt M (1995) Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1967-1971
- Neulen J, Raczek S, Pogorzelski MM, Grunwald K, Yeo T, Dvorak HF, Weich HA, Breckwoldt M (1998) Secretion of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor from human luteinized granulosa cells is human chorionic gonadotropin dependent. *Mol Hum Reprod* 4:203-206
- Neulen J, Wenzel D, Wunsch E, Weissenborn U, Büttner R, Weich HA (2001) Poor responder – high responder: the importance of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (sVEGFR-1) in ovarian stimulation protocols. *Human Reproduction in press*.
- Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC (1995) Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod* 50:239-247
- Nomura M, Yamanashi SI, Harada SI, Hayashi Y, Yamashita T, Yamashita J, Yamamoto H (1995) Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem* 270:28316-28324
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ (2000) Three dimensional collagen matrices induce delayed but sustained activation of gelatinase A in human endothelial cells via MT1-MMP. In *J Biochem Cell Biol* 32:621-631
- O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET (1995) The Transforming Receptor Tyrosine Kinase, Axl, Is Post-translationally Regulated by Proteolytic Cleavage. *J Biol Chem* 270:551-557
- Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U (1996a) Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2576-2581
- Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U (1996b) Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2576-2481

- Olofsson B, Korpelainen E, Mandriota S, Pepper MS, Aase K, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U (1998) VEGF-B binds VEGFR-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11709-11714
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastasis by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285
- Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S (1996) Identification of a C-fos gene that is related to the platelet derived/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11675-11680
- Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama, Otani T, Nakano R (1999) The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3845-3851
- Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo L, Alitalo K (1992) Flt-4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 52: 5738-5743
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N (1994) Placenta growth factor: potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vivo* and *in vitro*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 269:25646-25654
- Patterson C, Perrella MA, Hsieh CM, Yoshizumi M, Lee ME (1995) Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 270:23111-23118
- Patterson C, Perrella MA, Endege NO, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E (1996) Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 98:490-496
- Patterson C, Wu X, Lee ME, DeVault JD, Runge MS, Haber E (1997) Nuclear protein interactions with the human KDR/flk-1 promoter *in vivo*. *J Biol Chem* 272:8410-8416
- Pepper MS, Mandriota SJ (1998) Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2(Flk-2) expression in vascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 241:414-425
- Peters KG, De Vries C, Williams LT (1993) Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8915-8919
- Philips HS, Hains J, Leung D, Ferrara N (1990) Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 127:965-967
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature* 359:845-849
- Reynolds LP, Killilea SD, Grazul-Bilska AT, Redmer DA (1994) Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog Growth Factor Res* 5:159-175
- Richardson MD, Davis DW, Watson RH, Dunsford ML, Inman CB, Masson GM (1992) Cultured human granulosa cells as a model for corpus luteum function: relative roles of gonadotropin and low density lipoprotein studied under defined culture conditions. *Hum Reprod* 7:12-18
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, van Wezel (2000) Extracellular matrix in ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol* 163:73-76

- Röckl W, Hecht D, Sztajer H, Waltenberger J, Yayon A, Weich HA (1998) Differential binding characteristics and cellular inhibition by soluble VEGF receptors 1 and 2. *Exp Cell Res* 241:161-170
- Sato H, Takino T, Okadad Y, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994) A matrix metalloprotease expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65
- Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma T, Shibuya M (1996) Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor (PlGF), which is related to vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cell Growth Diff* 7:213-221
- Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Shibuya M (1997) The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLC-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 238:487-491
- Schenker JD, Weinstein D (1978) Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertil Steril* 30:255-268
- Seertharam L, Gotho N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M (1995) A unique signal transduction from FLT-1 tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 10:135-147
- Senger DR, Peruzzi CA, Feder J, Dvorak HF (1986) A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 46:5629-5632
- Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF (1993) Vascular permeability factor (VEGF, VPF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 12:303-324
- Shalaby F, Roussant J, Yamaguchi TP, Gertenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995) Failure of blood island formation in Flk-1 deficient mice. *Nature* 376:62-66
- Shen BQ, Lee DY, Gerber HH, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF (1998) Homologous up-regulation of KDR/flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor *in vitro*. *J Biol Chem* 273:29979-29985
- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Toyo A, Matsushime H, Sato M (1991) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5: 519-524
- Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L (1999) Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor -1 and -2. In: Claesson-Welsh L. *Vascular growth factors and angiogenesis*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp 60-83
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845
- Simon M, Gröne HJ, Jöhren O, Kullmer J, Plate KH, Risau W, Fuchs E (1995) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol* 268:240-250
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsburn M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for Tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87:1171-1180
- Tanaka K, Yamaguchi S, Sawano A, Shibuya M (1997) Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial cell growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase) *Jpn J Cancer Res* 88:667-676

- Takahashi T, Shibuya M (1997) The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGFR-receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 14:2079-2089
- ten Dijke P, Iwata KK (1989) Growth factors for wound healing. *Biotechnology* 7:793-798
- Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Show TB (1991) Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6: 1677-1683
- Tischer E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 265: 11947-11954
- Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF (1995) Increased gene expression of VEGF and VEGF receptors KDR/flk and flt in lungs exposed to acute or chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 95:1798-1807
- Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212
- Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD, Pietsch T, Wernert N (1999) Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* 59:5608-5614
- Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R (1997) The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association of VEGF levels and perfollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 12:1047-1055
- Vandenbunder B (1997) Angiopoietin-2, a novel molecular actor involved in vascular tree morphogenesis. *Bull Cancer* 84:1079-1080
- Viac J, Palacio S, Schmitt D, Claudy A (1997) Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 289:158-163
- Vidal F, Aragonés J, Alfranca A, de Landazuri MO (2000) Up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 after endothelial denudation: role of transcription factor Egr-1. *Blood* 95:3387-3395
- Vuorela P, Havta E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmaki E (1997) Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 56:489-494
- Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ (1982) Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 95:355-360
- Wakiya K, Begue A, Stehelin D, Shibuya M (1996) A cAMP responsive element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* 271:30823-30832
- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* 269:26988-26995
- Wang D, Donner DB, Warren RS (2000) Homeostatic Modulation of Cell Surface KDR and Flt-1 Expression and Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor RNAs by VEGF. *J Biol Chem* 275:15909-15911
- Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 91:695-704

- Wojtowicz-Praga S, Low J, Marshall J, Ness E, Dickson R, Barter J, Sale M, McCann P, Moore J, Cole A, Hawkins MJ (1996) Phase I trial of an novel matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB94) in patients with advanced cancer. *Invest New Drugs* 14:193-202
- Wu X, Patterson C (1999) the human KDR/flk-1 gene contains a functional initiator element that is bound and transactivated by TFII-I. *J Biol Chem* 274:3207-3214
- Wünsch E (1999) Untersuchungen zur Regulation des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in humanen Granulosazellen *in vitro*.
- Yabkowitz R, Meyer S, Yanaghire D, Brankow D, Staley T, Elliott G, Hu S, Ratzkin B (1997) Regulation of Tie Receptor expression on Human Endothelial Cells by Protein Kinase C-Mediated Release of Soluble Tie. *Blood* 90:7,6-715
- Yabkowitz R, Meyer S, Black T, Elliott G, Mereweather LE, Yamane HK (1999) Inflammatory Cytokines and VEGF stimulate the Release of Soluble Tie Receptor form Human Endothelial Cells via MMP Activation. *Blood* 93:1969-1979
- Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y (1997) Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *GENOMICS* 42:483-488
- Yamamoto S, Konishi T, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, Matsushita K, Hamid AA, Yura Y, Mori T (1997) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynaecol Endocrinol* 11:371-381
- Yamamoto S, Konishi T, Nanbu K, Komatsu T, Mandai M, Kuroda H (1997b) Immunolocalization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. *Gynecol Endocrinol* 11:223-230
- Yan Z, Weich HA, Bernhart W, Breckwolt M, Neulen J (1993) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA expression in luteinized human granulosa cells. *J Endocrinol Metab* 77:1723-1725
- Yan Z, Neulen, J, Raczek S, Weich HA, Keck C, Grunwald K, Breckwold M (1998) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/Vascular permeability Factor (VPF) production by luteinized huamn granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. *Gynecol Endocrinol* 12:149-153
- Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP (1996) Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, its receptor and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 56:2013-2016

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn **Dr. Herbert A. Weich** an der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF) Braunschweig in der Arbeitsgruppe „Wachstumsfaktoren und Rezeptoren“, Abteilung RDIF angefertigt.

Herrn Dr. Herbert A. Weich danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft und alle Anregungen.

Herrn **PD Dr. Geri Gross** danke ich herzlich für die Vertretung der Dissertation vor der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig.

Bei Herrn **Prof. Dr. Leopold Flohé** möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme des Korreferates bedanken.

Herrn **Prof. Dr. Joseph Neulen** an der RWTH Aachen danke ich für die interessanten Anregungen und die Bereitstellung der Follikelflüssigkeiten.

Mein Dank gilt der **Deutschen Forschungsgemeinschaft**, durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde.

Bei **Tanja Behn** und **Dr. Carsten Hornig** möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken. Sie haben mich nicht nur mit Tips, Ideen und Ü-Eiern unterstützt, sondern auch dafür gesorgt, daß trotz einer guten Portion Streß der Spaß an der Arbeit nicht verloren ging.

Bei **Dr. Kathleen Greger**, **Susanne Münch** und ganz besonders bei **Maren Brokelmann** möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und das angenehme und lustige Arbeitsklima bedanken.

Frau **Dr. Edda Wunsch** danke ich ganz herzlich für die Mengen an Granulosazellen, die Einblicke in den IVF-Bereich und die netten Abende in Aachen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei **meinen Eltern** für ihre stetige Unterstützung – in jeglicher Hinsicht – bedanken.

Vielen Dank auch an **Florian** – für alles!